



Rôle de l'édition de l'ARN par les enzymes ADAR dans les hémopathies malignes

Yaelle Eloit Dahan

► To cite this version:

Yaelle Eloit Dahan. Rôle de l'édition de l'ARN par les enzymes ADAR dans les hémopathies malignes. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01232223

HAL Id: dumas-01232223

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01232223>

Submitted on 23 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Nice Sophia-Antipolis

Faculté de Médecine

Année 2014

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ÉTAT de DOCTEUR en MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 08 Octobre 2014 par

YAELE ELOIT DAHAN

**RÔLE DE L'ÉDITION DE L'ARN PAR LES ENZYMES ADAR DANS
LES HÉMOPATHIES MALIGNES**

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Membres du jury

Monsieur le Professeur Jill-Patrice CASSUTO

Président

Monsieur le Professeur Nicolas MOUNIER

Assesseur

Monsieur le Professeur Paul HOFMAN

Assesseur

Madame le Docteur Isabelle SUDAKA-SAMMARCELLI

Assesseur

REMERCIEMENTS

A notre Maître et Président du jury,

Monsieur le Professeur CASSUTO,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Nous avons eu le privilège d'être interne dans votre service durant notre cursus et de bénéficier de la richesse de votre enseignement. Vous avez su éveiller en nous notre goût pour l'hématologie. Nous vous remercions infiniment pour votre accueil, votre disponibilité, vos conseils précieux et votre confiance.

Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre plus profond respect.

A notre Maître et Directeur de thèse,

Monsieur le Professeur BROUSSET,

Vous nous faites l'honneur de diriger ce travail de thèse.

Nous avons eu le privilège de travailler à vos côtés pendant notre internat et de bénéficier de l'ensemble de vos connaissances. Vous avez su nous transmettre votre curiosité scientifique. Nous vous remercions infiniment de nous avoir accueillies au sein de votre laboratoire et de nous avoir accordées toute votre confiance pour mener à bien ce projet. Nous vous remercions également pour votre précieux soutien dans la suite de notre parcours professionnel.

Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre plus profond respect et de notre plus grande admiration.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur SUDAKA-SAMMARCELLI,

Vous nous faites l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Nous avons eu la chance de travailler à vos côtés durant notre internat. Votre enseignement représente pour nous un tournant majeur dans notre cursus. Nous avons pu apprécier vos compétences cytologiques et médicales, votre rigueur professionnelle et votre dynamisme.

Votre patience, votre gentillesse, votre disponibilité nous ont guidé et ont grandement participé à notre goût pour la spécialité.

Puisse ce travail être le reflet de notre sincère gratitude et de notre respect profond.

A notre Maître et jury de thèse,

Monsieur le Professeur MOUNIER,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Nous avons eu le privilège de travailler à vos côtés et d'apprécier votre disponibilité, votre facilité d'analyse et votre ouverture d'esprit. Nous avons eu l'occasion d'apprendre énormément à la fois sur le plan théorique, clinique, scientifique et thérapeutique, tout cela dans une ambiance extrêmement détendue.

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A notre Maître et jury de thèse,

Monsieur le Professeur HOFMAN,

Votre présence dans notre jury est pour nous un grand honneur.

Nous vous remercions d'avoir aimablement accepté de juger ce travail et nous espérons qu'il saura vous intéresser. Votre enseignement et votre savoir reconnus de tous suscitent notre respect et notre admiration.

Nous vous exprimons par ce travail notre plus grand respect.

A ma famille :

A mon mari, Philippe, durant ces huit années tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Ton amour me porte au-devant de toutes les difficultés et me donne la force d'avancer plus loin chaque jour. Tu es la source de mon épanouissement personnel et professionnel. Je nous souhaite de vivre de nombreux moments de bonheur et de joie identiques à ceux de notre mariage. Je t'aime de tout mon cœur et ce jusqu'à la fin de ma vie.

A mon père, Jacques, que j'admire et qui compte énormément pour moi. Merci de m'avoir transmis les valeurs du travail, la persévérance et la force de se battre dans la vie. Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir, me conseiller, m'écouter et m'a apporté tout l'amour d'un « yiddishe pape ». J'ai toujours voulu que tu sois fier de moi, et j'espère par ce travail et l'ensemble de mon parcours avoir été à la hauteur de tout ce que tu m'as transmis.

A ma mère, Muriel, qui a toujours eu confiance en moi et qui n'a cessé de m'encourager tout au long de mes études. Merci d'avoir été à mon écoute et d'avoir apporté de la joie de vivre tous les jours dans notre maison. Je te remercie pour l'éducation que tu nous as transmise à mes sœurs et moi. Je serai toujours à tes côtés.

A ma sœur Nanie, avant même d'écrire ces mots je nous revois enfants en train d'apprendre la grammaire française à ton bureau rose et blanc...le temps passe si vite....Voilà que maintenant on s'apprête à devenir Docteur toutes les deux !! Pendant toutes ces années tu as toujours été là pour m'écouter, me conseiller, me faire rire et même dormir avec moi quand je n'avais pas le moral! Je suis fière de ce que tu es devenue. Tu vas énormément me manquer mais désormais je vais enfin avoir du temps et je viendrai souvent te voir à Londres !!

A ma sœur Jojo, mon double, ma fidèle et tendre confidente. Tu vois, quand je te demandais de fermer la porte de ta chambre lorsque tu révisais ton violon, je n'avais pas tort parce que ça y est j'y suis arrivée à la fin de ces études !!!! Merci de m'avoir comprise et soutenue. Ta présence à mes côtés a toujours été essentielle pour moi. Il me tarde qu'on reprenne nos conversations

interminables sur la vie, nos états d'âme et le chocolat !! Je suis également très fière de ce que tu es devenue et te souhaite de t'épanouir dans ta carrière professionnelle et amoureuse.

A mon frère Stephan, son épouse Karine et leurs enfants, vous avez suivi mon parcours depuis le début et m'avez toujours encouragée. Merci d'avoir été à mes côtés.

A mes beaux-parents, Michèle et René Dahan, merci de m'avoir accepté dès le premier jour dans votre famille et de m'avoir apporté tout votre soutien ainsi que votre amour. Vous comptez beaucoup pour moi. Michèle, merci de me comprendre aussi bien et de m'apporter tant d'affection, votre présence à mes côtés est essentielle.

A ma belle-sœur Lizou, tu es véritablement une sœur pour moi sans que cela n'enlève rien à ta beauté. Je suis très heureuse que vous nous ayez rejoint Olivier, Ava et toi à Toulouse. Tu es vraiment une personne géniale, je sais que je peux me confier à toi tout en rigolant à chaque fois qu'on se voit !! Ma Lizou je t'adore

A mon beau-frère Olivier, merci de ta patience et de gentillesse à mon égard. Ton soutien est très important pour moi.

A ma poupette Ava, ton arrivée dans la famille est une véritable source de joie et de bonheur, j'espère qu'avec Philippe nous t'apporterons rapidement un camarade de jeu.

A la mémoire de mes grands-parents : mémé Nancy, mémé Marie et pépé Hershl, je pense à vous très fort en ce jour et aurais aimé que vous soyez là. Merci pour tout l'amour que vous avez su m'apporter durant toute mon enfance.

A toute ma famille de Nice, Paris et Grenoble. A mes oncles, tantes, cousins et cousines, veuillez trouver dans ce travail le témoignage de toute mon affection.

A mes amis :

A ma « pepete » Laetitia, merci d'avoir été à mes côtés depuis le collège et de m'avoir toujours encouragée et soutenue. Tu es une personne très importante dans ma vie, toujours là quand j'ai besoin, à l'écoute avec des conseils redoutables à toute heure du jour et de la nuit ! Je ne sais pas ce que je ferais sans toi ma pepete, nous avons tellement de souvenirs ensemble, vivement ton mariage que ça en fasse un de plus !!

A ma Stefoune, mon amie depuis l'âge de trois ans !! Tu vois rien ne nous a jamais séparé, j'ai dans la tête tellement de fou rire quand je pense à nous deux, tu me manques beaucoup, et en l'honneur de notre amitié précieuse je nous souhaite de nombreux « po-tso-so » ensemble !!!

A ma Kri Kri d'amour, merci d'être une moumoune pleine d'amour, merci pour ton dynamisme et ta joie de vivre communicative !! Tu vois pour moi on est resté les stars du port de Nice !

A ma louloute Marine, il est loin le lycée et les révisions de la PCEM1 entrecoupées de pauses musicales et de virées en scooter ! On a fait les 400 coups ensemble il ne nous reste plus qu'à nous synchroniser pour nos futurs grossesses !

A mon chouchou Marina, la seule qui comprend toutes mes boulettes avant même que je les ai prononcées ! Tu vois nos révisions de physique avec pomme grany d'une main et glace bounty de l'autre nous ont menées à bon port !

A ma Caro, il est loin le temps des cours de religion du dimanche matin ! Notre amitié et notre complicité n'ont jamais connu de crise malgré la distance, tu es une vraie amie que je n'oublie pas.

A ma Meryl, voilà ma bichette, c'est fini les révisions de la PCEM1 et surtout de l'internat. Saches que je n'aurais jamais réussi sans toi et que grâce à toi, je ne garde que des bons souvenirs de notre préparation à l'ECN. Je te remercie d'avoir supporté tous mes tocs pendant ces dures années !! Tu es très précieuse pour moi, il me tarde d'être à ta thèse !

A mes amis niçois: Hervé, David, Franck vous m'avez vu grandir, vous serez toujours les bienvenus à Toulouse et promis on vous fera du tiramisu au spéculoos !

A Yonathan et Manue : vivement votre mariage qu'on refasse une grande et belle fête !

A Yohan et Claire, cette année promis, nous n'avons plus d'excuses on viendra vous voir à Limoges !

A Fabrice et Sonia, merci de m'avoir accepté si facilement et de nous faire partager tous ces moments de joie

A mes amis niçois : Barbara et Lad

A mes amis toulousains : Fabien, Edwige, Lionel, Jenny, Caroline, Agnès, Alexandre

Au personnel de l'hôpital

Le cursus d'interne m'a permis de passer dans de nombreux services et de rencontrer des personnes formidables qui ont contribué à transformer mon internat en une formidable expérience humaine. Je tiens à les remercier et plus particulièrement :

Aux médecins qui m'ont fait l'honneur de m'accueillir dans leurs services et qui ont grandement contribué à ma formation d'interne : Professeur Raynaud, Professeur Marty, Professeur Giordanengo, Professeur Van Obberghen, Professeur Sie, Professeur Pipau.

Aux médecins attachés à ces différents services qui m'ont accordé de leur temps, qui m'ont transmis leurs connaissances médicales et ce toujours dans une ambiance très agréable : Corinne Ferrero, Danielle Acquaronne, Hélène Billet, Maria Hamoir, Annie Appert, Florence Fisher, Didier Jambou, Pierre Toulon, Pascale Bayer, Patricia Ferrari, Luce Landraud, Alice Gaudart, Caroline Touati, Christelle Pomares, Pascale Delaunay, Martine Gari-Toussaint.

Aux médecins attachés et personnel infirmier du service d'hématologie clinique qui m'ont accueillie alors que j'étais déjà interne de biologie médicale et m'ont transmis le goût de l'hématologie

Au Docteur Henri Vinti, merci de votre gentillesse, votre patience, votre enseignement et votre humour qui ont rendu mes six mois d'hématologie clinique un véritable bonheur à tel point que je me suis même demandée si je n'étais pas faite pour faire de la clinique !!

A tout le personnel de jour des laboratoires et les secrétaires de biochimie, hématologie, parasitologie, bactériologie et hormonologie avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mes semestres d'internat

A l'équipe de nuit du laboratoire de réponse rapide de Saint-Roch : Myriam « mimi », Cathy, Claire, Samantha, Nicole, Philippe, Michel, Joanne, Amélie, Michaël, Jean-Laurent, et tous les autres que je n'ai pas cité mais que je n'oublie pas pour autant. Comme je vous l'ai souvent dit « vous m'avez vu grandir », grâce à vous mes gardes resteront des souvenirs extraordinaires je souhaite garder contact avec vous tous, vous allez me manquer !

A mes co-internes de Nice : une super dédicace à Julie « juju » et Julien : l'hématologie clinique avec vous c'était que du bonheur même si j'ai souvent râlé ! Je suis heureuse que vous ayez rejoint le clan obscur de la force des médecins aux microscopes !!

Merci à Anne Demonte pour son soutien durant tout l'internat, Juliette, Morgane, et les anciens Stefanie, Romain et Isabelle

A mes co-internes du laboratoire d'anatomie cytologie pathologique de Toulouse : merci à vous tous pour votre accueil et votre gentillesse à mon égard

A l'équipe INSERM UMR 1037 du Professeur Pierre Brousset du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse : Cathy Quelen (merci pour ton aide précieuse), Marie-Pierre Puissegur, Céline, Étienne, Camille, Laure et tous les autres, merci pour votre chaleureux accueil, votre gentillesse et votre aide précieuse

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	17
INTRODUCTION	19
I REVUE DE LA LITTÉRATURE	21
I.1 ÉDITION.....	22
I.1.1 ORIGINE ET ÉVOLUTION DES PROTÉINES ADAR.....	22
I.1.2 STRUCTURE DES ENZYMES ADAR.....	22
I.1.2.1 Structure d'ADAR1	23
I.1.2.2 ADAR1 p150 et ses multiples fonctions au-delà de l'édition	23
I.1.2.3 Structure d'ADAR2	24
I.1.2.4 Structure d'ADAR3	25
I.1.4 SUBSTRATS DES PROTÉINES	29
I.1.5 PRÉFÉRENCE NUCLEOTIQUE	30
I.1.6 FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ DES PROTÉINES	31
I.1.7 RÔLE PHYSIOLOGIQUE.....	32
I.1.8 RÔLE DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES	33
I.1.9 ÉDITION ET CANCÉROGENÈSE	36
I.1.10 RÔLE D'ADAR1 DANS LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	38
I.1.11 RÔLE D'ADAR1 DANS LES HÉMOPATHIES MALIGNES	39
I.2 LEUCÉMIE AIGUË MYÉLOBLASTIQUES	40
I.2.1 DÉFINITION ET CLASSIFICATION.....	40
I.2.2 LEUCÉMOGENÈSE : UN PROCESSUS MULTI-ÉTAPES.....	42
I.2.3 LAM AVEC CARYOTYPE ANORMAL.....	42
I.2.4 LAM AVEC CARYOTYPE NORMAL	45
I.2.4.1 Mutations ponctuelles	45
I.2.4.2 Modification épigénétique	46
II MATÉRIEL ET MÉTHODE DE L'ÉTUDE.....	48
II.1 OBJECTIFS	49
II.1.1 Objectif principal	49
II.1.2 Objectifs secondaires	49
II.2 POPULATION ÉTUDIÉE.....	49
II.3 MÉTHODE.....	49
II.3.1 Analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN (RNA-seq)	49
II.3.2 Identification des sites édités	50

II.4 MATÉRIEL.....	50
II.4.1 Culture cellulaire.....	50
II.4.2 Collecte et purification de cellules mononuclées issues du sang périphérique (PBMC) .	51
II.4.3 Conditions de stimulations des lymphocytes B et T	51
II.4.4 Cytométrie en flux	51
II.4.5 Extraction des protéines.....	52
II.4.6 Dosage des protéines	52
II.4.7 Western Blot	52
II.4.8 Extraction d'ARN.....	53
II.4.9 Reverse Transcription (RT) de l'ARN et réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (quantitative) ou qPCR.....	53
III RESULTAT	57
III.1 ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 DANS DIFFERENTES HEMOPATHIES MALIGNES :	58
III.1.1 Profils d'expression des protéines ADAR en Western blot (WB) dans des lignées de lymphome et de leucémies	58
III.1.1.1 Analyse dans les lymphomes B et T.....	58
III.1.1.2 Analyse dans les leucémies aiguës : LAL et LAM	59
III.1.2 Profil d'expression des ARNm des enzymes ADAR par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) dans les lymphomes et les leucémies.....	60
III.1.2.1 Analyse dans les lymphomes B et T.....	60
III.1.2.2 Analyse dans les leucémies aiguës : LAL et LAM	62
III.2 ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 EN CONDITION BASALE PUIS ACTIVEE DANS DES LYMPHOCYTES B CD19+ ET DES LYMPHOCYTES T CD4+	63
III.2.1 Principes de l'activation des lymphocytes B et T in vitro	63
III.2.2 Analyse de l'activation des lymphocytes B et T in vitro.....	63
III.2.3 Niveaux d'expression des enzymes ADAR dans les lymphocytes B et T dans différentes conditions expérimentales	64
III.2.4 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes sains et des lymphocytes tumoraux	65
III.2.4.1 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes B sains et des lymphocytes B tumoraux	66
III.2.4.2 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes T sains et des lymphocytes T tumoraux.....	66
III.3 ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DE 40 PATIENTS AVEC LAM A CARYOTYPE NORMAL: RECHERCHE DE SITES EDITES	68
III.3.1 Identification de sites édités chez des patients atteints de LAM avec caryotype normal	68
III.3.2 Bilan des analyses bioinformatiques	68

III.3.2.1 Analyse dans les séquences non codantes	69
III.3.2.2 Analyse dans les séquences codantes	69
III.3.3 Analyse du niveau d'expression des enzymes ADAR chez les 40 patients	70
IV DISCUSSION	71
IV.1 NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 DANS DIFFERENTES HEMOPATHIES MALIGNES :	72
IV.1.1 Synthèse des résultats de Western Blot et de qRT-PCR	72
IV.1.2 Bilan après activation lymphocytaire : comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre les lymphocytes sains et les lymphocytes tumoraux	73
IV.2 IDENTIFICATION DE SITES EDITES CHEZ 40 PATIENTS AVEC LEUCÉMIE AIGUË MYÉLOBLASTIQUES AVEC CARYOTYPE NORMAL ...	73
IV.2.1 Stratégie d'analyse des données bioinformatiques : limiter les faux positifs.....	74
IV.2.2 Sites édités dans les LAM avec caryotype normal.....	74
IV.2.3 Conséquences de l'édition dans les LAM avec caryotype normal.....	75
IV.2.4 Potentiels faux négatifs	76
IV.2.5 Niveau d'expression des enzymes ADAR chez 40 patients atteints de LAM.....	77
BIBLIOGRAPHIE	79
RÉSUMÉ	91
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	92

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT_{2C}R : 5 HydroxyTryptamine (serotonine) Récepteur 2C

ADAR : Adenosine Deaminase Acting on RNA

ADAT : Adenosine Deaminase Acting on tRNA

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique

AID : Activation-induced cytidine deaminase

AMP : adénosine monophosphate

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic component1

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

CD : Cluster of Differentiation

CDA : Cytidine Deaminase

CREB : cAMP responsive element binding protein

dbSNP : Database Single Nucleotide Polymorphism

DNMT : DNA méthyltransférase

DRBPS : dsRNA binding proteins

dsRBDs : double-stranded RNA-binding domains

dsRNA : double-stranded RNA

ECS : Editing site complementary sequence

eIF2 : eucaryotic Initiation Factor 2

EST : expressed sequence tag

FAB : Franco-Américano-Britannique

GluR-B : Glutamate Récepteur B

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone désacétylase

HRM : High Resolution Melt

HSCs : cellules souches hématopoïétiques

ICE : inosine chemical erasing

IFN : interféron

IgG : Immunoglobuline G
ISRE : Interferon-sensitive response element
KCS : kinase-conserved sequence
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAL-B : Leucémie Aiguë Lymphoblastique B
LAL-T : Leucémie Aiguë Lymphoblastique T
LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMNH : Lymphome Malin non Hodgkinien
LPS : lipopolysaccharides
NF90 : Nuclear factor 90
NOD/SCID : Non-Obese Diabetic/ Severe Combined ImmunoDeficiency
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
PHA : phytohématogglutinine
PTPN6 : Protein Tyrosine Phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6)
PKR : protéine kinase R
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
Q/R : glutamine/arginine
qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA-seq : RNA-sequencing
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SMD : Syndrome Myélodysplasique
SNC : système nerveux central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
ssRNA : single-stranded RNA
UTR : UnTranslated Region
WB : Western blot

INTRODUCTION

L'édition est un mécanisme enzymatique qui modifie la séquence d'une molécule d'ADN ou d'ARN par insertion, délétion ou conversion de nucléotides.

Ce processus initialement découvert dans l'ARN mitochondrial des trypanosomes (organisme unicellulaire), met en évidence l'insertion post-transcriptionnelle de 4 résidus uraciles (U). Cette modification est à l'origine de nouveaux codons stop ne correspondant à aucune séquence génomique (*Benne, Van den Burg et al. 1986; Gerber, Keller et al. 2001*). Ainsi, l'édition de l'ARN est un processus post-transcriptionnel qui génère une séquence différente de celle de l'ADN génomique et contribue à la diversité du transcriptome et des protéines.

Ce n'est que peu de temps après, que l'édition des organismes pluricellulaires évolués (mammifères) est mise en évidence et dont les principales conversions sont représentées par la substitution d'une cytosine (C) en uracile (U) et d'une adénosine (A) en inosine (I). Elles sont catalysées par deux grandes familles d'enzymes : les protéines APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic component1) et les protéines ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) respectivement.

Les protéines APOBEC appartiennent au groupe d'enzyme cytidine déaminase (CDA) qui inclue également les protéines AID (activation-induced cytidine deaminase). Elles catalysent toutes deux la conversion d'une cytosine en uracile sur de l'ARN et de l'ADN respectivement. Les protéines APOBEC en éditant une cytosine en position 6666 (C⁶⁶⁶⁶) de l'ARNm du gène *apoB* modifie le codon glutamine (CAA) en un codon stop (UAA) prématuré et génère une protéine tronquée, ApoB48 (*Gerber, Keller et al. 2001; Powell, Wallis et al. 1987*). Ainsi, l'apolipoprotéine B (Apo B) du fait de l'édition de son ARNm présente deux isoformes synthétisées à partir d'un même transcrit: ApoB48 de localisation intestinale correspond à la forme éditée de la protéine tandis qu'ApoB100 synthétisée dans le foie correspond à la forme longue de la protéine (*Powell, Wallis et al. 1987*). Les protéines AID éditent quant à elles l'ADN des lymphocytes B du centre germinatif ganglionnaire et sont impliquées dans le réarrangement des gènes d'immunoglobulines et dans la diversité des anticorps (*Park 2012*).

Les enzymes ADAR, issues de l'évolution des protéines CDA, convertissent quant à elles une adénosine (A) en inosine (I) sur de l'ARN messager et contribuent à la diversité des protéines.

La première partie de ce travail sera consacrée à la description de la structure et du mécanisme d'action des enzymes ADAR. Nous proposerons une revue de la littérature des études ayant porté sur leur rôle physiologique et dans la cancérogenèse. Puis nous conclurons cette partie avec le rôle des protéines ADAR dans les cellules souches et les hémopathies malignes.

Dans une deuxième partie, nous décrirons notre étude qui est composée de deux sous parties. La première porte sur l'analyse du niveau d'expression des protéines dans plusieurs types de tumeurs hématopoïétiques à partir de lignées cellulaires humaines. La deuxième est consacrée à l'analyse du transcriptome de 40 patients atteints de leucémie aiguë myéloblastiques avec caryotype normal. Ainsi, l'identification de potentiels sites édités par les enzymes ADAR pourrait contribuer à une meilleure compréhension du rôle de ces protéines dans la leucémogenèse, d'améliorer la stratification des patients à risques, voire même permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

I REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 ÉDITION

I.1.1 ORIGINE ET ÉVOLUTION DES PROTÉINES ADAR

Présente chez tous les organismes vivants, l'édition par conversion d'une adénosine en inosine est tout d'abord apparue sur les ARN de transfert. Cette réaction, catalysée par les enzymes ADAT (adenosine deaminase acting on tRNA) joue un rôle essentiel dans le processus de traduction puisqu'en modifiant la première base de l'anticodon, elles permettent de nouveaux appariements de bases et augmentent la capacité de reconnaissance des ARNt (*Gerber, Keller et al. 2001*). Il est couramment admis que les enzymes ADAR ont évolué à partir des protéines ADAT par l'acquisition de motifs de liaison à l'ARN double-brins (dsRBDs) (*Savva Yiannis, Rieder et al. 2012*) puisqu'elles présentent une homologie de séquence au niveau de leur site catalytique (*Maas S, Geber et al. 1999*). Ces enzymes, restreintes aux métazoaires, sont apparues après la scission entre les protozoaires et les métazoaires il y a 700 millions d'années mais n'ont été découvertes il y a seulement 25 ans (*Jin, Zhang et al. 2009*). Les gènes ADAR sont retrouvés de l'homme à l'anémone de mer mais sont clairement absents chez les levures, les plantes et les champignons. Ces enzymes, sont hautement conservées entre les espèces bien que leurs nombres de gènes et d'isoformes diffèrent. Le génome humain possède trois gènes codant pour trois protéines ADAR tandis que le nématode *Caenorhabditis elegans* n'en possède que deux (*CeADR1, CeADR2*) et la drosophile un seul (*Savva Yiannis, Rieder et al. 2012*).

I.1.2 STRUCTURE DES ENZYMES ADAR

La famille des protéines ADAR possède trois membres localisées sur trois chromosomes distincts : les chromosomes 1, 21, 10 respectivement pour ADAR1, 2 et 3 (*Gallo, Galardi et al. 2008; Tomaselli, Bonamassa et al. 2013*). Ces enzymes, actives sous la forme d'homodimères ont une structure conservée entre elles avec un nombre variable de domaine de fixation à l'ARN double-brin à leur extrémité N-terminale et leur site catalytique à leur extrémité C-terminale (*Cho, Yang et al. 2003*).

I.1.2.1 Structure d'ADAR1

ADAR1 fut la première protéine identifiée (Kim, Wang et al. 1994; Wang 2011). Localisée sur le chromosome 1 (Weier, George et al. 1995), elle possède trois domaines de fixation à l'ARN double-brin à son extrémité N-terminal (**Figure 4**) et présente quelques isoformes dont les deux principales: ADAR1 p110 et ADAR1 p150 sont issues de l'épissage alternatif de l'exon 1 à partir de deux promoteurs différents. La forme constitutive de l'enzyme est représentée par ADAR1 p110 ou forme courte tandis qu'ADAR1 p150 ou forme longue possède deux éléments de réponse à l'interféron : ISRE et un KCS dans son promoteur, et correspond à l'isoforme interféron inducible (ADAR1-i). Synthétisée en présence d'IFN α , β , γ (Der, Zhou et al. 1998; Patterson, Thomis et al. 1995), l'expression d'ADAR1 p150 est rapidement augmentée en conditions inflammatoires dans les lymphocytes et les macrophages (Yang, Luo et al. 2003). Bien que les deux isoformes possèdent la même activité catalytique, elles présentent des différences de structure mais également de localisation (George, Samuel et al. 1999; Liu, George et al. 1997).

I.1.2.2 ADAR1 p150 et ses multiples fonctions au-delà de l'édition

En effet, ADAR1 p150 possède un domaine de fixation ($Z\alpha$) (**Figure 4**) supplémentaire à l'ADN au niveau de son extrémité N-terminale lui permettant de se fixer à l'ADN de conformation Z pendant la transcription et de contribuer à la régulation de l'expression des gènes (Herbert, Schade et al. 1998; Oh, Kim et al. 2002). D'autre part, ADAR1 p150 est principalement localisée dans le cytoplasme cellulaire car elle possède un signal d'export situé au niveau de son domaine supplémentaire $Z\alpha$ qui lui permet d'interagir spécifiquement avec le récepteur d'export soluble CMR1 (Poulsen, Nilsson et al. 2001; Strehblow, Hallegger et al. 2002) contrairement à ADAR1 p110 qui est principalement localisée dans le noyau (Fritz, Strehblow et al. 2009).

De part sa localisation, ADAR1 p150 joue un rôle important dans la réponse immunitaire antivirale: tantôt pro-viral tantôt antiviral. En effet, lorsqu'ADAR1 p150 édite le virus de l'EBV responsable du sarcome de Kaposi chez les immunodéprimés (Gandy, Linnstaedt et al. 2007; Iizasa, Wulff et al. 2010), ou encore le virus de l'hépatite C (Polson, Bass et al. 1996; Taylor,

Puig et al. 2005) ou du cytomegavirus (CMV) (*Nachmani, Zimmermann et al. 2014*), elle inhibe le cycle réplcatif viral et permet leur élimination. A l'inverse, ADAR1 p150 induit la persistance dans l'organisme de certains virus tel que le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (*Doria, Davis et al. 2009*) ou le virus de la rougeole et les rend plus agressif. Dans ces cas, la persistance de l'infection virale n'est pas liée à l'édition mais repose sur l'interaction d'ADAR1 p150 avec une autre protéine : la protéine kinase dépendante d'ARN double brin ou PKR (*Nie, Hammond et al. 2007*). Cette protéine, également synthétisée en réponse à l'IFN phosphoryle un résidu sérine ou thréonine du facteur d'initiation de la traduction eIF2. Le facteur d'initiation eIF2 une fois phosphorylé ne peut plus initier la traduction et la réplication du virus est ainsi inhibée. L'interaction d'ADAR1 p150 avec PKR par ses domaines de fixation à l'ARNds (dsRBD) l'inhibe (*Wang, Samuel et al. 2009*). Par conséquent eIF2 non phosphorylé initie la traduction et permet au virus de se répliquer. Ainsi, l'inflammation induite par les virus fait intervenir de nombreuses protéines en réponse à la sécrétion d'interféron (PKR, NF90 et IRF3 (interferon regulatory transcription factor-3) dont ADAR1 p150 (*Wang, Choi et al. 2008*) qui de par son interaction avec elles les inhibent (*Nie, Ding et al. 2005*), supprime l'apoptose des cellules et diminue de ce fait la réponse inflammatoire antivirale (*Toth, Cattaneo et al. 2009*).

I.1.2.3 Structure d'ADAR2

Tout comme ADAR1, ADAR2 possède plusieurs isoformes (**Figure 4**) qui résultent d'épissage alternatif et sont essentiellement localisées dans le système nerveux central. Leur expression est induite par le facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein) en présence d'AMP cyclique (*Kawahara, Ito et al. 2005; Mittaz, Scott et al. 1997; Peng, Zhong et al. 2006*). L'isoforme ADAR2a, correspond à l'isoforme majoritaire, constituée de deux domaines de fixation à l'ARN double-brin et d'un domaine catalytique, elle diffère de l'isoforme ADAR2b qui possède une séquence *Alu* au niveau de son domaine catalytique et présente par conséquent une activité deux fois moins importante qu'ADAR2a (*Gerber, O'Connell et al. 1997*). L'isoforme ADAR2-R qui correspond à la forme minoritaire (<5%) ne présente aucune différence d'activité catalytique par rapport à ADAR2a mais possède un exon supplémentaire au niveau de son domaine N-terminale qui code pour un domaine riche en arginine ou lysine appelé R domain (*Maas, Gommans et al. 2009*). Ce domaine, également retrouvé chez ADAR3, a la capacité d'interagir avec de l'ARN simple brin (ssRNA) (*Maas, Gommans et al. 2009*). Enfin, il existe une isoforme d'ADAR2 qui résulte de l'édition

d'ADAR2 sur son propre ARNm. En effet, par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, ADAR2 édite son ARNm, et induit la création d'un nouveau site d'épissage à l'origine d'une protéine tronquée dépourvue d'activité catalytique (*Feng, Sansam et al. 2006; Rueter, Dawson et al. 1999*). Ce mécanisme permet un contrôle de son activité.

I.1.2.4 Structure d'ADAR3

ADAR3, dont l'expression est restreinte au SNC (amygdales et thalamus), ne possède aucune activité d'édition du fait de son incapacité à former des homodimères au niveau de son site catalytique (*Cho, Yang et al. 2003*). Cette enzyme serait davantage un inhibiteur de l'activité d'édition des deux autres enzymes en séquestrant leurs substrats par l'intermédiaire de ses domaines de fixation à l'ARN double-brin (**Figure 1**) (*Chen, Cho et al. 2000*).

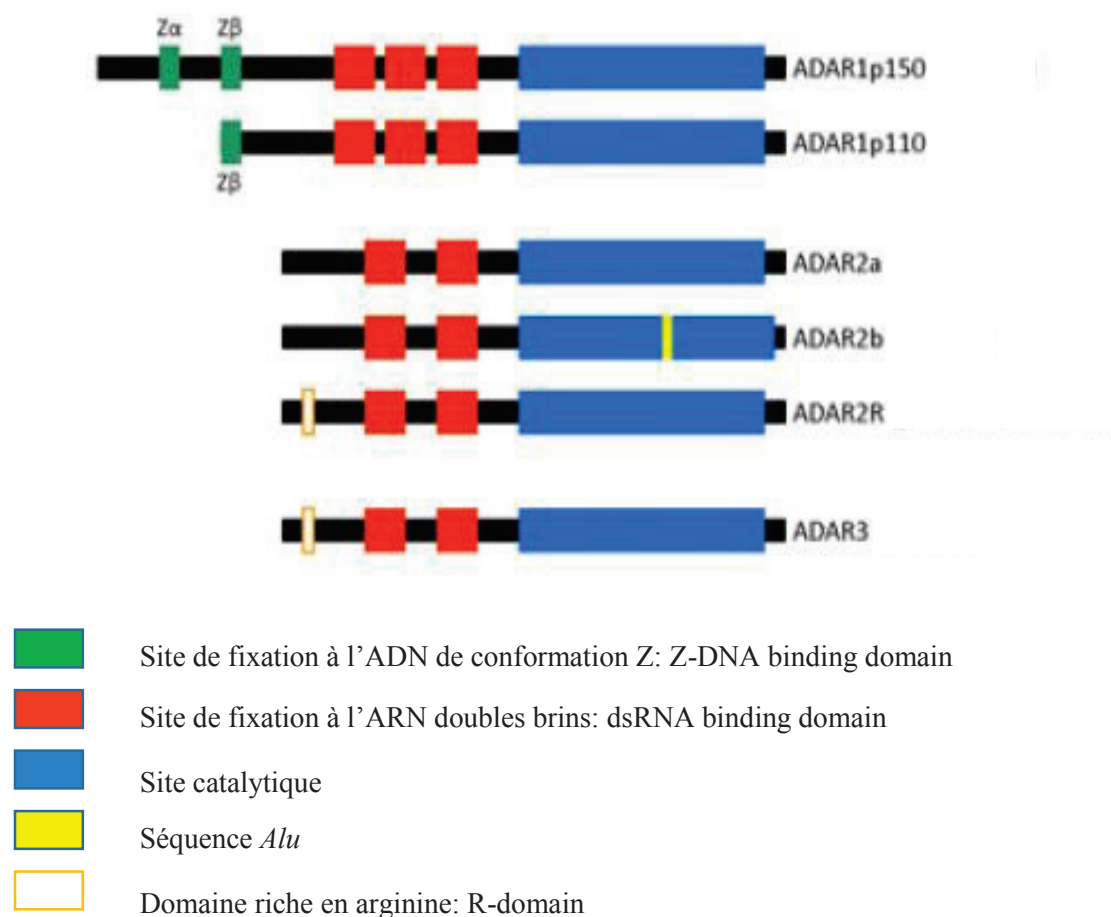


Figure 1: Structure des différentes isoformes des protéines ADAR chez l'humain

I.1.3 MÉCANISMES D'ACTION DES ENZYMES ADAR

Les enzymes ADAR ou ARN double-brin adenosine deaminase font partie des protéines qui ont la particularité de se fixer sur de l'ARN double-brin : les dsRNA binding proteins (DRBPs). En effet, un ARN peut avoir une structure double-brin s'il s'apparie à lui-même ou à un autre ARN par des liaisons faibles, ou encore s'il présente une structure secondaire ou tertiaire comme un pseudo-nœud (structure contenant deux éléments en épingle à cheveux) (*Lamoril, Ameziane et al. 2010*). Les DRBPs regroupent des protéines telles que PKR, DICER, Staufen, NF90. Elles possèdent toutes un nombre variable de sites de fixation à l'ARN : les dsRNA binding domains (dsDRBDs) et s'y fixent de manière non spécifique sur de courte séquence d'environ 11 paires de bases (pb). Elles peuvent également interagir entre elles par l'intermédiaire de l'ARN ou par leurs dsDRBDs. Elles jouent des rôles divers et sont impliquées dans la transcription, l'épissage, la stabilité, le transport, la réponse immunitaire et la régulation de l'expression des gènes. La plupart des modèles murins portant des mutations hétérozygotes ou homozygotes pour l'une de ces protéines ont un phénotype embryonnaire létal (*Saunders, Barber et al. 2003*).

Les enzymes ADAR catalysent la déamination de l'adénosine en inosine sur le carbone en position C6 par un mécanisme de « base-flipping », mécanisme également employé par d'autres enzymes telles que les enzymes N6 ADN méthyltransférase, qui permet la bascule de l'adénosine à éditer au niveau de la poche du site catalytique (*Hough, Bass et al. 1994; Kuttan, Bass et al. 2012; Polson, Bass et al. 1994; Yi-Brunozzi, Stephens et al. 2001*). Puis la réaction de déamination s'effectue en présence d'eau, d'inositol hexaphosphate et de Zinc. C'est la structure des protéines par cristallographie qui a permis de mettre en évidence la présence d'un quadruple d'acide aminé : HECC essentiel pour leur activité (**Figure 2**). L'acide glutamique (E396) au centre du domaine catalytique de l'enzyme forme des ponts hydrogène avec la molécule d'eau et permet le transfert de protons tandis que l'histidine (H394) et les deux cystéines (C451 et C516) coordonnent avec le zinc l'attaque nucléophile du carbone. L'inositol hexaphosphate intervient quant à lui pour stabiliser la structure et permet « un bon folding » de la protéine nécessaire à son activité (*Keegan, Leroy et al. 2004; Macbeth, Schubert et al. 2005; Wulff, Nishikura et al. 2010*). Cette réaction induit la substitution d'une adénosine en inosine qui est ensuite reconnue par le ribosome et les reverse transcriptases comme une guanosine (G) (*Basilio, Wahba et al. 1962*). Ainsi, la comparaison de marqueurs de séquences exprimées (EST ou expressed sequence tag) qui sont de courtes portions séquencées d'un ADN

complémentaire, avec les séquences génomiques ont permis de visualiser un G sur l'ADNc à la place d'un A sur l'ADNg et c'est cette différence qui est retenue comme critère d'édition (Wulff, Sakurai et al. 2011) (**Figure 2, 3, 4**).

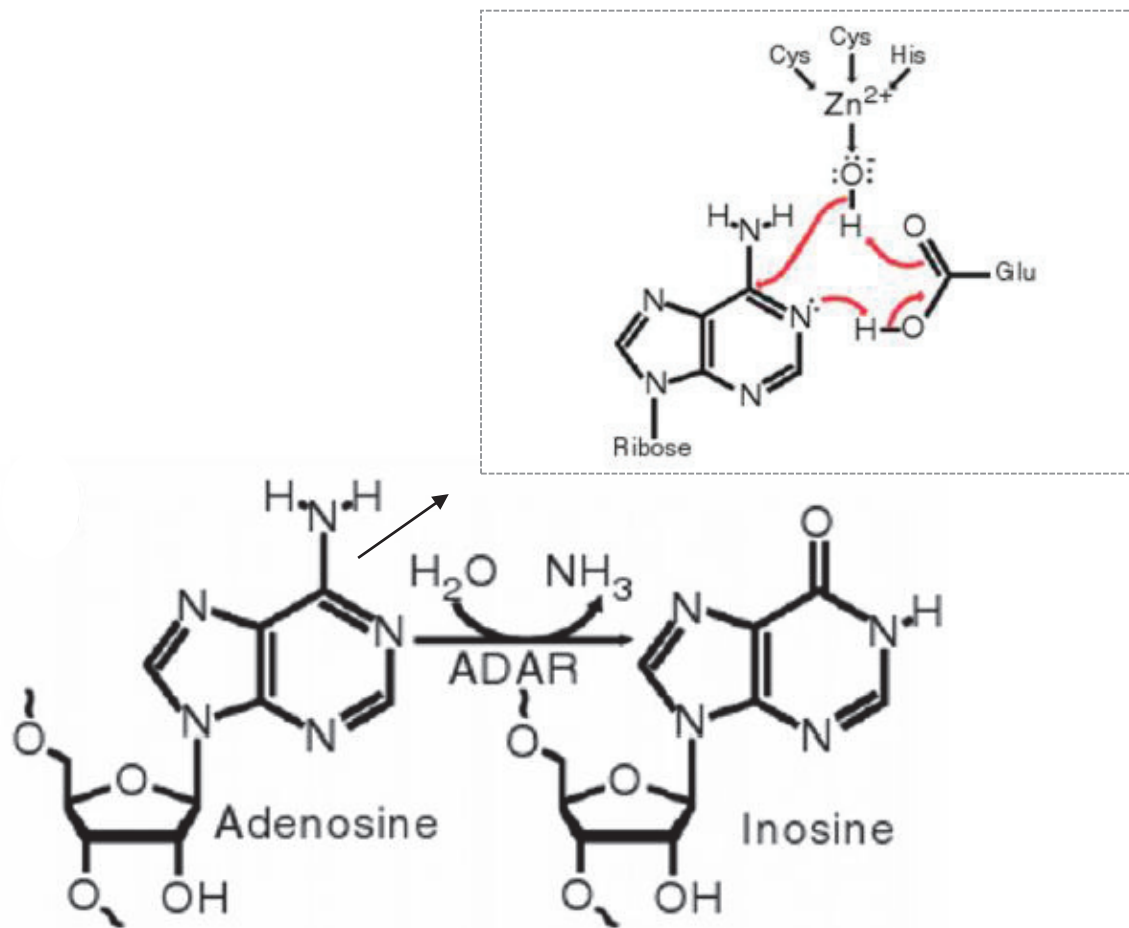


Figure 2 : Mécanisme de déamination hydrolytique d'une adénosine en inosine catalysée par les enzymes ADAR. L'encadré illustre l'attaque nucléophile du carbone par la molécule d'eau avec les quatre acides aminés essentiels du site catalytique des enzymes qui coordonnent la réaction (modifiée d'après Wulff, Nishikura et al. 2010).

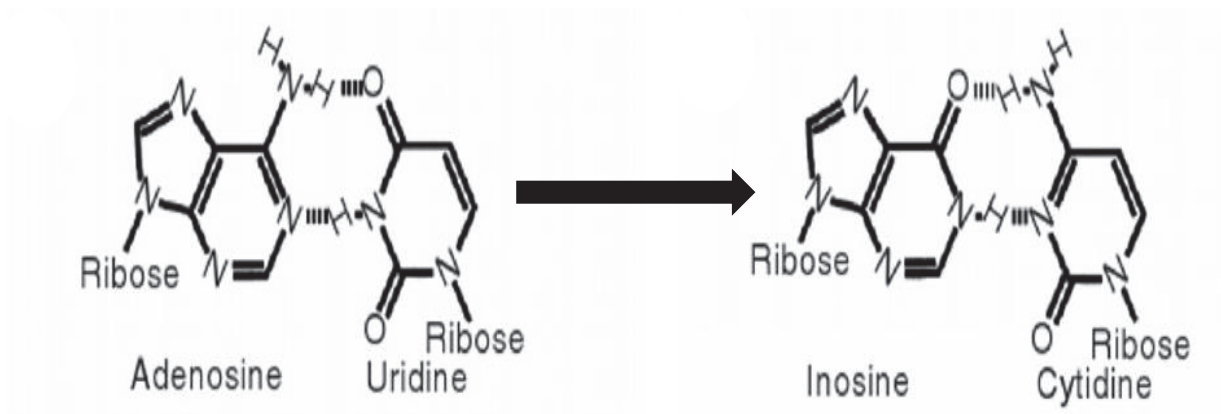


Figure 3 : Conséquences de l'édition. L'adénosine s'apparie avec l'uridine au cours de rétrotranscription de l'ARN en ADN. Après édition, l'inosine s'apparie à une cytidine et correspond à une guanosine au cours de la traduction (modifiée d'après Wulff, Nishikura et al. 2010).

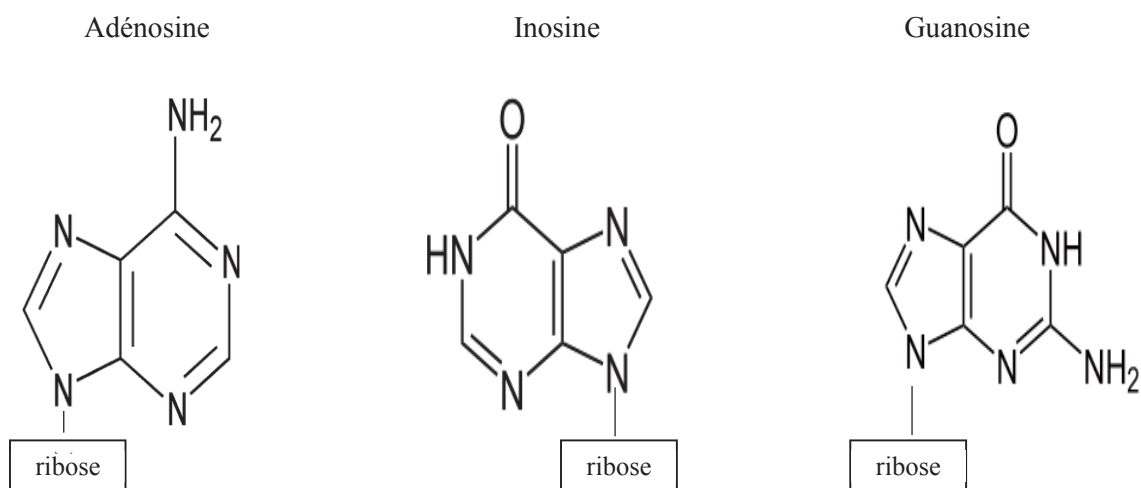


Figure 4 : Structure chimique de l'adénosine, l'inosine et la guanosine. Elles appartiennent toutes les trois à la famille des bases azotées à base purique.

I.1.4 SUBSTRATS DES PROTÉINES

Les enzymes ADAR éditent les adénosines de l'ARN double-brin (*Lehmann, Bass et al. 2000; Rieder, Staber et al. Nature 2013*) adoptant une structure en épingle à cheveux dont l'exemple classiquement cité résulte de la complémentarité imparfaite entre un exon et son intron sous-jacent (**Figure 5**). Cette structure d'au moins 15 paires de bases (pb), appelée séquence complémentaire au site d'édition ou ECS, est parfaitement représentée par le site Q/R de la sous-unité B du récepteur au glutamate. En effet, ce site principalement édité par ADAR2 dans le système nerveux central, résulte de la complémentarité imparfaite entre l'exon 11 et l'intron 11 du pré-ARNm et adopte une forme en épingle à cheveux (*Higuchi, Single et al. 1993*).

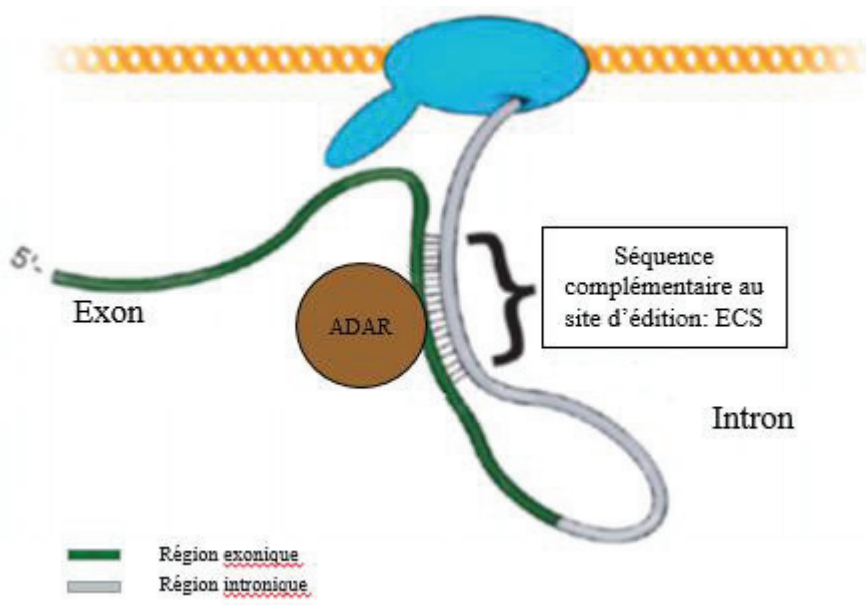
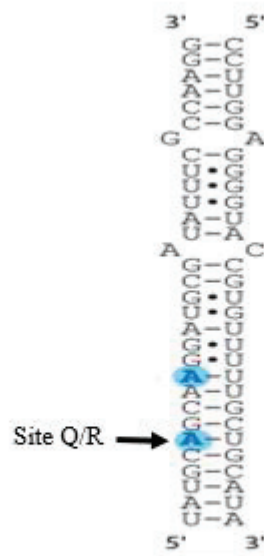


Figure 5: Séquence complémentaire au site d'édition. Structure en épingle à cheveux qui résulte de la complémentarité imparfaite entre un exon et son intron sous-jacent (modifiée d'après Wulff, Nishikura et al. 2010).

L.1.5 PRÉFÉRENCE NUCLEOTIQUE

L'interaction des enzymes avec leur substrat ne requiert pas de séquence spécifique, cependant deux critères fondamentaux sont requis: la structure double-brin de l'ARN et l'environnement nucléotidique de l'adénosine à éditer. La reconnaissance de la structure est effectuée par leurs domaines de fixation à l'ARNds. L'environnement correspond quant à lui au choix de l'adénosine à éditer, il correspond à la préférence nucléotidique, qui est contrôlée par leur domaine catalytique (*Stephens, Haudenschild et al. 2004*). L'édition est dite sélective lorsqu'elle a lieu sur des séquences de moins de 20 nucléotides ou sur des séquences non appariées où seulement 10% des adénosines sont éditées. A l'inverse, l'édition est non sélective quand il s'agit de séquences longues d'environ 100 nucléotides ou de séquences courtes appariées ou encore de structures instables (mésappariements A : C) où plus de 50% des adénosines sont éditées (*Bass 2002*). Bien qu'elles aient des substrats communs certains substrats sont préférentiellement édités par l'une ou l'autre des deux enzymes. En effet, l'ARNm du récepteur au glutamate présente trois sites d'édition dont un commun aux deux enzymes : le site R/G tandis que le site Q/R est édité par ADAR2 (**Figure 6**) et le site +60 (intronic hotspot soit boucle interne) par ADAR1. De même, l'ARNm du récepteur à la sérotonine 5-HT_{2C}R présente 5 sites d'édition dont un commun aux deux enzymes : le site E, tandis que les sites A et B sont édités par ADAR1 et les sites C et D par ADAR2 (*Cho, Yang. 2003*). Ces différences s'expliquent par la préférence nucléotidique des enzymes (*Eggington, Greene et al. 2011; Kuttan, Bass et al. 2012*). En effet, ADAR1 et ADAR2 présentent toutes deux une préférence nucléotidique du côté 5' de l'adénosine éditée notamment un A ou un U davantage qu'un C ou un G (A=U>C=G) mais ADAR2 présente également à la différence d'ADAR1 une préférence du côté 3' de l'adénosine éditée à savoir U=G>C=A (**Figure 6**) (*Eggington, Greene et al. 2011; Kuttan, Bass et al. 2012; Lehmann, Bass et al. 2000; Polson, Bass et al. 1994*).



Pré-ARNm de la sous-unité B du récepteur au glutamate

Adénosine éditée par ADAR2

Figure 6 : Préférence nucléotidique d'ADAR2. Le pré-ARNm de la sous-unité B du récepteur au glutamate possède des sites spécifiquement édités par ADAR2 qui illustrent le principe de préférence nucléotidique avec du côté 5' de l'adénosine à éditer une adénosine ou une cytosine et un uracile ou une guanosine à son côté 3' (modifié d'après Barraud, Allain et al. 2012).

I.1.6 FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ DES PROTÉINES

L'activité des protéines est ensuite modulée par différents facteurs tels que la localisation de leurs substrats qui génère un mouvement des protéines de leurs compartiments cellulaires (Desterro, Keegan et al. 2003; Fritz, Strehblow et al. 2009; Maas, Gommans et al. 2009; Sansam, Wells et al. 2003), les modifications post-transcriptionnelles à type de sumoylation pour ADAR1, (Desterro, Keegan et al. 2005) et de phosphorylation, d'ubiquitination (Marcucci, Brindle et al. 2011), ou encore d'autoédition pour ADAR2 (Feng, Sansam et al. 2006; Rueter, Dawson et al. 1999).

I.1.7 RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Le rôle physiologique de l'édition a d'abord été mis en évidence dans le système nerveux central du fait de sa richesse en substrats édités principalement représentés par les récepteurs aux neurotransmetteurs qui demeurent parmi les plus étudiés et les plus largement décrits. Parmi eux, les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), dont le principal neurotransmetteur est le glutamate, sont des récepteurs ionotropes présents au niveau des membranes post-synaptiques des neurones et sont impliqués dans la plasticité et la transmission rapide de l'influx nerveux. En effet, les neurones pré-synaptiques relarguent du glutamate dans l'espace inter membranaire qui induit après fixation à son récepteur post-synaptique l'ouverture du canal ionique permettant ainsi aux ions calcium du milieu extracellulaire d'entrer massivement dans les neurones. L'influx calcique dépolarise la membrane post-synaptique et permet la transmission rapide de l'influx nerveux (*Seeburg, Higuchi et al. 1998*). Ces récepteurs au glutamate sont au nombre de quatre sous-unités (GluR-A, B, C, D) et forment par leurs domaines transmembranaires un canal ionique. Tous sont perméables au calcium hormis GluR-B du fait de la présence d'une arginine au niveau de la portion transmembranaire du canal à la place d'une glutamine présente dans toutes les autres sous-unités. Cette différence résulte de l'édition par ADAR2 de l'adénosine de l'exon 11 du pré-ARNm de la sous unité B du récepteur au glutamate (*Lomelli, Mosbacher et al. 1994; Melcher, Maas et al. 1995; Melcher, Maas et al. 1996; Rueter, Burns et al. 1995; Schoft, Schopoff et al. 2007*). Ainsi le codon (CAG) codant pour une glutamine (Q) de charge neutre est remplacé par un codon (CGG) qui code pour une arginine (R) chargée positivement. Cette nouvelle charge positive rend le canal imperméable au calcium et régule de ce fait l'influx nerveux (*Higuchi, Single et al. 1993*). Près de 99% des récepteurs GluR-B exprimés à la surface des neurones sont présents sous la forme édité (*Sommer, Khöler et al. 1991*) et les souris *ADAR2* (+/-) ou *ADAR2* (-/-) décèdent 3 semaines après la naissance de crises d'épilepsie secondaire à l'hyperexcitabilité neuronale liée à l'excès d'influx de calcium dans les neurones (*Higuchi, Maas et al. 2000*). Parmi les autres exemples de neurotransmetteur édité, le récepteur à la sérotonine 5HT_{2C}R fait également parti des plus étudiés. Il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui après activation par la sérotonine, stimule la phospholipase C et génère du diacylglycérol, de l'inositol hexaphosphate et du calcium afin de stimuler la membrane post-synaptique. L'édition de 5HT_{2C}R concerne cinq sites (A-E) situés au niveau de la seconde boucle intracellulaire du récepteur. Elle touche trois codons : AUA (isoleucine), AAU (asparagine) et AUU (isoleucine) et modifie jusqu'à six acides aminés différents soit un

total de 24 isoformes possibles du récepteur. Toutes ces isoformes altèrent l'activité du récepteur et diminuent son affinité pour la sérotonine (*Lanfranco, Seitz et al. 2009; Wang, O'Brien et al. 2000*). Il n'est donc pas surprenant qu'un dysfonctionnement dans la machinerie d'édition soit impliqué dans diverses pathologies humaines telles que la dépression et la schizophrénie (récepteur à la sérotonine) ou encore dans la sclérose latérale amyotrophique et l'épilepsie (récepteur au glutamate) (*Mass, Kawahara et al. 2006*).

I.1.8 RÔLE DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES

Initialement décrit au niveau des séquences codantes, l'édition contribue à la diversité du transcriptome. Pourtant les gènes codant pour des protéines (soit 25 000 gènes) ne représentent que 2% du génome humain, la plus grande partie (70-90%) étant essentiellement composée d'ARN non codant c'est-à-dire : d'introns, de séquences 3' et 5'UTRs et petits ARN. Il ne paraît donc pas surprenant que l'édition concerne en réalité davantage de sites, soit 1,4 million recensés chez l'humain, récemment identifiés par l'intégration de données bioinformatiques couplées au séquençage haut débit de nouvelle génération (*Ramaswami, Lin et al. 2014*). Ces sites, principalement localisés au niveau de séquences non codantes représentent 33% de l'activité des enzymes au niveau des introns et environ 67 % dans les régions 3' et 5' UTR (*Bahn, Lee et al. 2012; Bazak, Haviv et al. 2014; Levanon, Eisenberg et al. 2004*). L'édition de ces régions s'explique en partie du fait de leur forte proportion en séquences *Alu*, séquences d'environ 130 pb riche en adénosine dupliquées en tandem sur le même pré-ARNm, qui adoptent une structure en épingle à cheveux, et correspondent ainsi à de parfaits substrats pour les enzymes ADAR (*Grover, Mukerji et al. 2004*). Ainsi, du fait de la multitude de ses substrats, localisés aussi bien au niveau de séquences codantes, qu'au niveau de séquences non codantes, l'édition contribue à la diversité du transcriptome mais également à la régulation de l'expression des gènes, la création ou la destruction de site d'épissage, et la stabilité de l'ARNm. En effet, parmi les nombreux mécanismes régulant l'expression des gènes, les petits ARN non codants (non traduit en protéine) ou microARN, jouent un rôle fondamental. Ces ARN, localisés au niveau d'introns de gènes sont générés dans le noyau sous la forme d'un transcrit primaire le pri-miARN, constitué de structures en boucle. Celui-ci est clivé en pré-miARN par le complexe protéique de type Drosha puis exporté dans le cytoplasme où un autre complexe protéique dénommé Dicer, le clive en ARN simple brin qui correspond au microARN mature. Le microARN s'apparie ensuite au niveau de la région 3'UTR de son ARNm cible et induit une inhibition de la traduction ou une lyse de l'ARNm (*Lamoril, Ameziane et al. 2010*). Ainsi, en

interférant avec l'ARNm, les microARN répriment la traduction et modulent l'expression protéique. Les enzymes ADAR en éditant ces ARN, et ce à n'importe quelle étape de leur biogénèse, participe à la régulation de l'expression des gènes. Selon le stade de maturation du microARN, les conséquences observées sont différentes. Lorsqu'elle concerne les précurseurs des microARN, soit 16% d'entre eux dans le SNC, elle inhibe leur clivage par les enzymes Drosha ou Dicer (**Figure 7**) et diminue la production de microARN matures (*Kawahara, Megraw et al. 2008*). Ces pri-miR hyperédités sont ensuite dégradés dans le noyau par le Tudor-SN (Tudor staphylococcal nuclease), ribonuclease qui dégrade spécifiquement les ARN double-brin riche en inosine (*Blow, Grocock et al. 2006; Iizasa, Wulff et al. 2010; Kawahara, Zinshteyn, Chendrimada et al. 2007; Scadden 2005; Yang, Chendrimada et al. 2006*). Lorsqu'elle touche des microARN matures, l'édition contribue à leur diversité ainsi qu'à celles de leurs cibles (*Blow, Grocock et al. 2006; Choudhury, Tay et al. 2012; Kawahara, Zinshteyn et al. 2007*). D'autre part, l'édition modifie également les cibles des microARN lorsqu'elle touche des séquences 3'UTR de l'ARNm (*Gu, Buaas et al. 2012; Liang, Landweber et al. 2007; Peng, Cheng et al. 2012*). L'édition des précurseurs des petits ARN interférents (siARN) induit également une diminution du nombre de siARN matures et modifie de ce fait l'expression des gènes (*Scadden, Smith et al. 2001*). Par ailleurs, les protéines ADAR en interagissant avec d'autres protéines telles que HuR, régule l'expression des gènes et contribue à la stabilité des transcrits d'ARNm (*Wang, So et al. 2013*).

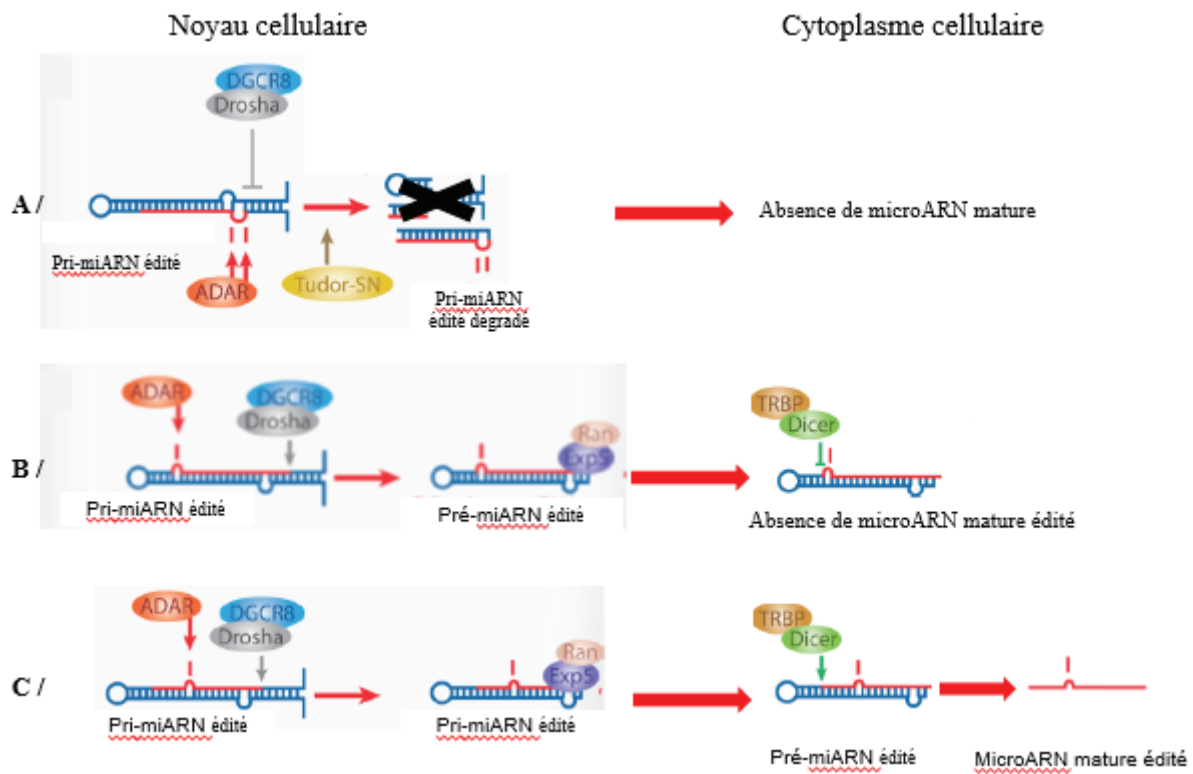


Figure 7: Conséquences de l'édition sur la biogénèse des microARN (modifiée d'après Nishikura 2010)

A/ L'édition des pri-miARN dans le noyau peut inhiber leur clivage en pré-miARN par le complexe enzymatique Drosha/DGCR8 et diminue la synthèse de microARN mature dans le cytoplasme. Les pri-miARN hyperédités sont ensuite dégradés dans le noyau par le Tudor-SN.

B/ L'édition d'un pré-miARN peut inhiber le clivage par le complexe enzymatique Drosha/TRBP dans le cytoplasme et diminue la synthèse de microARN mature.

C/ En fonction du site, l'édition de pri-miARN peut permettre la synthèse de microARN mature édité qui aura par conséquent différentes cibles si le site édité concerne la "tête" du microARN

I.1.9 ÉDITION ET CANCÉROGENÈSE

En raison du nombre important de substrats soumis à l'édition et de son rôle sur la régulation de l'expression des gènes, il ne paraît pas donc pas surprenant qu'une dérégulation de ce processus soit impliqué dans le développement et la progression tumorale. En effet, en fonction du type de tumeurs, l'hyper édition ou au contraire l'hypo édition, pourrait être à l'origine de l'activation de proto-oncogènes ou de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*Choudhury, Tay et al. 2012; Hochberg, Gilead et al. 2013*). Certains auteurs évoquent même un parallèle entre le statut méthylé des gènes et le statut édité de l'ARN et proposent des profils d'édition différents en fonction des tumeurs (*Paz, Levanon et al. 2007*). Bien que certaines tumeurs notamment les hépatocarcinomes (*Chen, Li et al. 2013*) ou les leucémies aigues (*Jiang, Crews et al. 2013; Ma, Chong et al. 2011*) présentent un statut d'hyperédition associée à une augmentation d'expression des enzymes, la plupart des autres: prostatiques, testiculaires, pulmonaires, rénales (*Paz, Levanon et al. 2007*), cutanées (*Hochberg, Gilead et al. 2013*) présentent plutôt un statut d'hypoédition. Parmi elles, les tumeurs du système nerveux central sont les plus étudiées en raison de sa forte proportion en sites édités. En effet, on observe pour ces tumeurs une diminution d'activité et d'expression des enzymes d'autant plus importante que la tumeur est sévère et agressive (*Cenci, Barzotti et al. 2008; Choudhury, Tay et al. 2012; Maas, Patt et al. 2001*). Par exemple, pour les glioblastomes, il existe une hypoédition de la sous-unité B du récepteur au glutamate (**Figure 8**) mais également du microARN 376a* (*Calin, Croce et al 2006; Zhang, Huang et al. 2006*). Dans le cerveau, miRNA 376 a* édité a pour cible AMFR (autocrine motility factor), récepteur qui promeut la migration et l'invasion des cellules, et RAP2A (Ras related protein) lorsqu'il n'est pas édité, qui est un gène suppresseur de tumeur contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans les glioblastomes, la dérégulation de l'édition induit l'accumulation du miRNA 376-a* non édité et par conséquent l'hyperexpression de la protéine AMFR à l'origine de la migration et de l'invasion des cellules glioblastiques *in vitro* (*Choudhury, Tay et al. 2012*). Cet effet correspond en pratique clinique à la rapidité d'extension de la tumeur et la faible survie des patients. D'autre part, il semblerait qu'ADAR2 possède un rôle de gène suppresseur de tumeur et contrôle la prolifération cellulaire dans le SNC par son activité d'édition sur les protéines régulatrices du cycle cellulaire et les voies de signalisation comme Akt. Ainsi, la diminution de son expression et par conséquent de son activité enzymatique contribue à l'initiation de la tumeur dans les glioblastomes (*Galeano, Rossetti et al. 2013; Ishiuchi, Yoshida et al. 2007*).

Parmi les mécanismes permettant d'expliquer la diminution d'expression des enzymes dans les tumeurs, seule l'étude de Nemlich *et al* (Nemlich, Greenberg *et al.* 2013) sur les mélanomes, a permis de mettre en évidence que la surexpression de microARN tel que miR17-5p et miR432 ayant pour cible en 3'UTR l'ARNm d'*ADAR1*, était à l'origine de sa diminution d'expression.

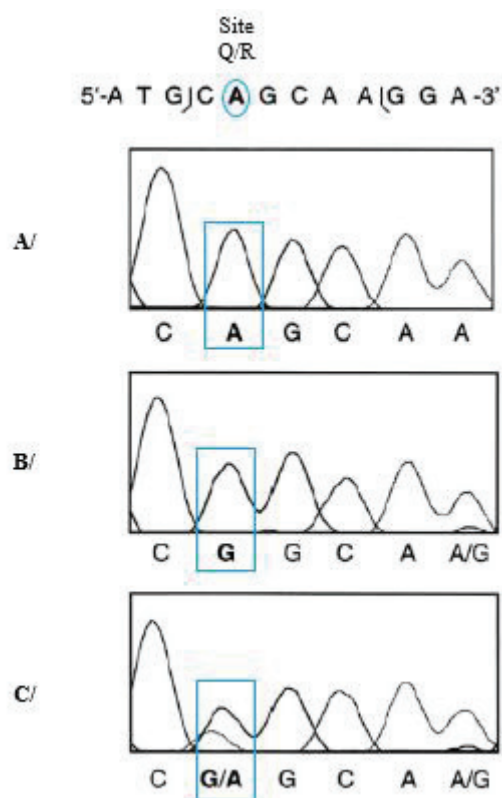


Figure 8: Edition du pré-ARNm de la sous-unité B du récepteur au glutamate dans le système nerveux central sain et dans les glioblastomes (modifié d'après Maas, Patt *et al.* 2001). *A/* Séquençage direct de GluR-B à partir d'ADN génomique humain. *B/* Séquençage de GluR-B à partir d'ADN complémentaire de tissu cérébral sain humain : la présence d'un pic de guanosine atteste de l'édition de l'adénosine du site Q/R par ADAR2. *C/* Séquençage de GluR-B à partir d'ADN complémentaire issu de glioblastome cérébral : diminution du pic de guanosine secondaire à l'hypédition du site Q/R.

I.1.10 RÔLE D'ADAR1 DANS LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Au cours du développement depuis le stade embryonnaire jusqu'au stade adulte, on observe une augmentation variable de l'activité d'édition selon les tissus associée à une augmentation d'expression des enzymes. Cela suggère que l'édition est un processus régulé au cours de l'embryogénèse et qu'il est tissu spécifique (*Jacobs, Fogg et al. 2009; Shtrichman, Germanguz et al. 2012; Wahlstedt, Daniel et al. 2009*). L'analyse phénotypique des souris knockout pour *ADAR1* ou *ADAR2* a permis de mettre en évidence des différences essentielles entre ces deux enzymes. En effet, alors que les souris *ADAR2* (-/-) décèdent après la naissance de troubles neurologiques avec crises d'épilepsies, les souris *ADAR1* (-/-) décèdent quant à elles *in utero* à E11.0 - E12.5 (jours embryonnaires) (*Wang, Khillan et al. 2000*) en raison d'un large processus apoptotique (*Wang, Miyakoda et al. 2004*) qui atteint tous les tissus (*George, Wagner et al. 2005*) et d'un arrêt précoce de l'hématopoïèse avec absence d'érythrocytes matures et nécrose hépatocytaire (*Hartner, Schmittwolf et al. 2004*).

L'érythropoïèse embryonnaire murine débute aux alentours de E7.5 (jours embryonnaires) au niveau du sac vitellin puis le foie prend le relais vers E11-12 et produit des érythrocytes matures ainsi que les précurseurs de la lignée myéloïde. Aux alentours de E15 les cellules hématopoïétiques atteignent la rate et la moelle osseuse qui produira à partir de la naissance et pendant toute la vie adulte l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Or, l'expression d'*ADAR1* est détectable chez les souris dès E7.5 avec un pic à E15 ce qui correspond à la période d'érythropoïèse embryonnaire (*Wang, Khillan et al. 2000*). Le rôle d'*ADAR1* au cours de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte a été mis en évidence par un système de knockout conditionnel dans les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) issues du foie fœtal murin et de la moelle osseuse de souris. En effet, *ADAR1* semble essentielle à la survie et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques puisqu'en son absence, ces cellules perdent leurs capacités à proliférer *in vitro* et à reconstituer l'ensemble des différentes lignées hématopoïétiques *in vivo* après greffe de moelle osseuse sur des souris NOD/SCID irradiées (*Hartner, Walkley et al. 2009; XuFeng, Boyer et al. 2009*). D'autre part, l'analyse du transcriptome des cellules souches hématopoïétiques multipotentes de souris *ADAR1* (-/-) met en évidence une globale surexpression des gènes induits par l'IFN de type I (α, β) et de type II (γ) (*Iizasa, Nishikura et al. 2009*) qui confère à *ADAR1* un rôle d'inhibiteur de la signalisation par interféron qui pourrait expliquer l'apoptose de tous les tissus embryonnaire en son absence, bien que le mécanisme en cause demeure inconnu (*Laxminarayana, Khan et al. 2007*). Par

ailleurs, l'absence de différenciation cellulaire, l'apoptose cellulaire et l'inflammation diffuse observées dans les HSCs en l'absence d'*ADAR1* sont également retrouvées dans toutes les cellules souches, qu'elles soient embryonnaires (*Osenberg, Paz et al. 2010*), de la peau (*Sharma, Wang et al. 2011*) ou des cryptes intestinales (*Qiu, Wang et al. 2013*).

I.1.11 RÔLE D'ADAR1 DANS LES HÉMOPATHIES MALIGNES

De par son rôle primordial dans le maintien du bon équilibre entre cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, il ne paraît pas surprenant qu'ADAR1 soit impliqué dans la leucémogénèse. En effet, l'étude de Beghini *et al* (*Beghini, Ripamonti et al. 2000*) a identifié un nouveau transcrit dérivé d'un épissage aberrant de la protéine tyrosine phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6) dans les cellules blastiques CD34+/CD117+ (c-Kit⁺) de patients atteints de leucémie aigue myéloïde. Ce transcrit, résulte de l'édition de l'adénosine A⁷⁸⁶⁶ du point de branchement du pré-ARNm de PTPN6 qui induit la rétention de l'intron 3 et de ce fait la synthèse d'une protéine non fonctionnelle. Or, cette protéine, impliquée dans des voies de prolifération des cellules myéloïdes à un rôle de suppresseur de tumeur qui est supprimé par l'édition de son ARNm et induit par conséquent la prolifération tumorale. Dans cette étude les auteurs ne déterminent pas l'enzyme ADAR responsable. Seul deux études récentes ont identifiées des profils d'expression différentiels en fonction du type de leucémies avec (*Ma, Chong et al. 2011*) une surexpression d'ADAR1 p110 par rapport à ADAR1 p150 chez des enfants atteints de LAL-B et une diminution de son expression pour les patients en rémission. La seconde étude, (*Jiang, Crews et al. 2013*) compare le transcriptome de patients atteints de leucémie myéloïde en phase chronique versus celui de patients en phase blastique et montre une augmentation d'expression des gènes induits par l'interféron γ , dont l'isoforme ADAR1 p150 pour les patients en phase blastique. Dans cette étude, l'hyperexpression d'ADAR1 p150 par infection lentivirale de progéniteurs hématopoïétiques entraîne une augmentation de son activité d'édition dont les principales conséquences sont l'augmentation d'expression du facteur de transcription myéloïde PU.1 et la production d'un variant tronqué de la protéine glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), tyrosine kinase impliquée dans la différenciation cellulaire et l'apoptose (*Steinman, Yang et al. 2013*). D'après les auteurs, ADAR1 p150 contribue à la progression des patients atteints de LMC vers la transformation en phase aigüe en induisant la reprogrammation des progéniteurs myéloïde par le biais de PU.1 et l'auto-renouvellement des cellules initiatrices de leucémie par la production d'un variant tronqué de GSK3 β .

I.2 LEUCÉMIE AIGUË MYÉLOBLASTIQUES

I.2.1 DÉFINITION ET CLASSIFICATION

Le terme leucémie est un terme général qui désigne une prolifération maligne du tissu hématopoïétique caractérisé par une expansion clonale de cellules immatures (leucémie aigüe) ou mature (leucémie chronique). La nature du clone engagé définit le type de leucémie : myéloïde ou lymphoïde. Il existe quatre principaux types de leucémies : les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les leucémies myéloïdes chroniques (LMC).

Les LAM peuvent survenir à tout âge mais leur incidence s'accroît avec ce dernier. Elles représentent la première cause d'hospitalisation prolongée dans les services d'hématologie pour adultes et sont de mauvais pronostic (*Deschler, Lübbert et al. 2006*). Elles sont caractérisées par la prolifération monoclonale de progéniteurs myéloïdes avec blocage de la différenciation. Sur le plan morphologique, il est habituel d'utiliser la classification Franco-Américano-Britannique (FAB) comprenant 8 groupes (LAM0 à LAM7) selon le type et le degré de différenciation (granuleuse, monocyttaire, érythroblastique ou mégacaryocytaire). La classification OMS regroupe quant à elle des éléments cliniques, morphologiques, cytogénétiques et moléculaires et reconnaît 7 groupes (**Tableau 1**) (*Vardiman, Thiele et al. 2009*).

LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	
LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; AML1-ETO	
LAM avec t(15;17) (q22;q12) ; PML-RARA	
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22) ; CBFB-MYH11	
LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL	
LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214	
LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1	
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1	
Entités provisoires :	LAM avec mutation NPM1
	LAM avec mutation CEBPA
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	
Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique	
Ou présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des myélodysplasies	
Ou présentant une dysplasie sur > 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes	
LAM post chimiothérapie	
LAM sans spécification particulière	
LAM avec différenciation minime	
LAM sans maturation	
LAM avec maturation	
LA myélomonocytaire	
LA monoblastique / monocytaire	
LA érythroïde : LA érythroïde pure	
LA mégacaryoblastique	
LA à basophile	
Panmyélose aiguë avec myélofibrose	
Sarcome granulocyttaire	
Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle	
Myélopoïèse anormale transitoire	
LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle	
Néoplasie dendritique plasmocytoïde blastique	

Tableau 1 : Classification OMS des leucémies aiguës myéloïdes et hémopathies apparentées (2008). (D'après Vardiman, Thiele et al. 2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes, Blood, 2009).

I.2.2 LEUCÉMOGENÈSE : UN PROCESSUS MULTI-ÉTAPES

Bien que l'étiologie exacte des leucémies ne soit pas connue, leur développement associe de nombreux facteurs de risques dont l'âge, les antécédents d'hémopathie, les anomalies génétiques congénitales, l'exposition aux virus et aux radiations. La leucémogenèse est un processus multi-étapes qui associe un événement oncogénique bloquant la différenciation et un deuxième induisant la prolifération cellulaire. Ces événements résultent de réarrangements moléculaires à type de translocations, de mutations ponctuelles et de modifications épigénétiques, susceptibles de modifier l'expression des gènes. Ces mutations portent le plus souvent sur des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont des gènes à caractère dominant, qui, lorsqu'ils sont exprimés de façon dérégulée ou lorsque leur structure est altérée, contribuent au phénotype transformé d'une cellule. Ils codent pour de nombreuses protéines dont les facteurs de transcription et les protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs, sont quant à eux des gènes ayant un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire et sont impliqués dans le maintien de la stabilité du génome, la réparation de l'ADN et l'apoptose cellulaire. Ainsi, les mutations portant sur ces gènes conduisent à un déséquilibre entre prolifération, différenciation et apoptose cellulaire, à l'origine du phénotype leucémique observé.

I.2.3 LAM AVEC CARYOTYPE ANORMAL

En fonction du type de réarrangement moléculaire observé, les LAM peuvent avoir un caryotype normal ou anormal. Près de 50 à 80% d'entre elles sont associées à des caryotypes anormaux qui résultent le plus souvent de translocations chromosomiques (*Deschler, Lübbert et al. 2006; Look 1997; Uribealgo, Di Croce et al. 2011*). Ces translocations sont à l'origine de réarrangements génétiques principalement localisés au niveau de facteurs de transcription de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation et la survie des progéniteurs hématopoïétiques. Elles génèrent deux types d'anomalies : celle qui dérégule l'expression d'un gène (anomalie quantitative) et celle qui produit un gène chimérique (anomalie qualitative). Les anomalies quantitatives activent généralement des proto-oncogènes, elles résultent de l'expression d'un gène peu ou pas exprimé dans les cellules mis sous la dépendance d'un nouvel élément de régulation issu d'un autre gène qui est quant à lui fortement exprimé dans cette même cellule, et entraîne la surexpression d'une protéine normale (**Figure 9**). Ce type de translocation est rarement observé dans les pathologies myéloïdes hormis la surexpression du

gène *EVII* à la suite de translocation impliquant la région chromosomique 3q26 (*De Weer, Speleman et al. 2008*). Elles peuvent également s'appliquer aux microARN notamment mir125b qui est surexprimé suite à la translocation t(2 ;11)(p21 ;q23) chez les patients atteints de LAM et de SMD et affecte la différenciation des cellules myéloïdes (*Bousquet, Quelen et al. 2008*). Les anomalies qualitatives (**Figure 10**) induisent quant à elles, la création d'un nouveau gène qui résulte de la fusion d'entre deux gènes et dont la protéine chimérique résultante possède des propriétés altérées. C'est le cas dans plus de 90% des LMC et dans environ 30% des LAL-B de l'adulte ou la translocation t(9;22)(q34;p11) aboutit à la formation d'un chromosome communément appelé chromosome de Philadelphie, et dont la protéine fusion correspondante possède une activité kinase incontrôlée à l'origine de la dérégulation du cycle cellulaire (*Shtivelman, Lifshitz et al. 1985*). Les cellules blastiques dépendantes de cette nouvelle voie de signalisation sont donc plus sensibles à son inhibition. D'où le développement d'agents pharmacologiques ciblant la fonction et/ou la stabilité de protéines oncogéniques comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (l'imatinib mesylate) qui améliorent la survie des patients (*Deininger, Buchdunger et al. 2005; Thomas, Cancelas et al. 2008*). C'est également le cas des leucémies aiguës promyélocyaires (LAM3) où l'oncoprotéine PML-RAR alpha générée par la translocation t(15;17)(q24;q21), inhibe des gènes critiques pour la différenciation myéloïde et induit l'expansion de précurseurs bloqués au stade promyélocytaire (*Castaigne, Chomienne et al. 1990; Yoshida, Kitamura et al. 1996*).

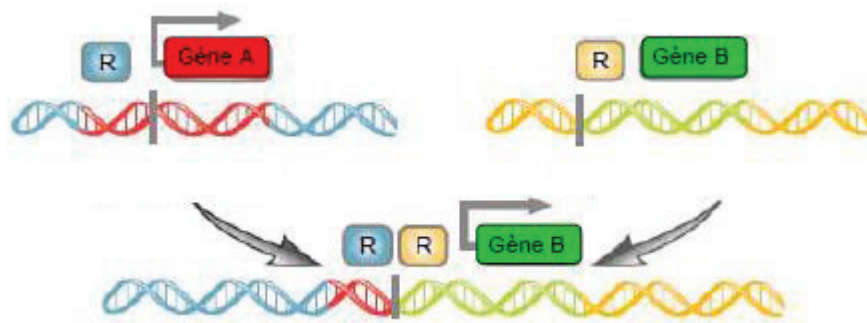


Figure 9 : Principe d'une anomalie quantitative. Après réarrangement, le gène B peu ou pas exprimé dans la cellule est sous la dépendance transcriptionnelle des éléments régulateurs R d'un gène A fortement exprimé dans cette cellule. D'après Look 1997.



Figure 10 : Principe d'une anomalie qualitative. Après le réarrangement chromosomique, le gène A et B fusionne pour donner un nouveau gène chimérique en phase sous dépendance transcriptionnelle des éléments régulateurs R du gène situé en 5'. D'après Look 1997.

I.2.4 LAM AVEC CARYOTYPE NORMAL

I.2.4.1 Mutations ponctuelles

Si la plupart des LAM sont associées à des anomalies caryotypiques, il existe pourtant dans près de 40 à 50% des cas aucune anomalie visible au caryotype. Dans ces cas le développement de la pathologie est lié à des anomalies de séquence au niveau des gènes, induites par un réarrangement moléculaire à type de mutations ponctuelles ou de modifications épigénétiques. Elles touchent comme précédemment des facteurs de transcription intervenant dans la différenciation des cellules myéloïdes et/ou des gènes impliqués dans des processus plus généraux tels que la prolifération ou la survie cellulaire. La caractérisation de telles mutations est importante pour définir des groupes pronostic de patients qui bénéficient d'une prise en charge thérapeutique adaptée. Elles sont désormais intégrées dans la classification OMS 2008 (**Tableau1**) qui permet la classification de la plupart des LAM avec caryotype normal (*Dohner, Estey et al. 2010*).

Parmi les mutations les plus fréquentes, celles du gène NPM1 sont observées dans 30% à 60% des LAM avec caryotype normal (*Cheng, Sportoletti et al. 2010; Federici, Falini et al. 2013*). Toutes induisent la production d'un variant tronqué de NPM1 qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules leucémiques et confère un avantage prolifératif aux cellules (*Cheng, Sportoletti et al. 2010; Grisendi, Pandolfi et al. 2005*). Elles s'associent souvent à des mutations dans le domaine tyrosine kinase du gène FLT3. Ce récepteur, exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques, présente dans 20% des LAM à caryotype normal une duplication en tandem de son domaine juxta-membranaire (FLT3-internal domain : FLT3-ITD) ou une mutation ponctuelle dans la boucle d'activation située dans son domaine tyrosine kinase (FLT3-tyrosine kinase domain : FLT3-TKD) (*Yamamoto, Kiyoi et al. 2001*). Elles entraînent une activation constitutive du récepteur capable de rendre la prolifération des cellules hématopoïétiques autonomes et donc indépendamment des facteurs de croissance (*Hayakawa, Towatari et al. 2000*). Elles sont associées à un mauvais pronostic avec risque élevé de rechute pour les patients (*Kottaridis, Gale et al. 2002*).

Parmi les mutations moins fréquentes, celles du gène codant pour C/EBP α , gène clé dans le processus de la différenciation des granulocytes. Elles concernent 10% des LAM de type 1 ou de type 2 (*Pabst, Mueller et al. 2001; Pabst, Mueller et al. 2009*) tandis que celles des gènes IDH1 et IDH2 découvertes plus récemment à l'issu du séquençage haut débit de l'intégralité du génome de cellules blastiques sont présentes dans 16% des LAM avec caryotype normal (*Mardis, Ding et al. 2009*).

I.2.4.2 Modification épigénétique

Les mécanismes de régulations épigénétiques interviennent également dans le processus multi-étapes de la leucémogénèse. Ces modifications post-transcriptionnelles répriment ou activent l'expression des gènes et portent principalement sur les cytosines (méthylation), les histones (acétylation), les adénosines (édition) et les micro-ARN. La méthylation des cytosines contenues dans les îlots CpG est catalysée par le groupe des DNA méthyltransférases (DNMT), tandis que les changements post-traductionnels des histones modifiant la structure de la chromatine implique les enzymes histones acétyltransférases (HAT) et désacétylases (HDAC). Parmi elles, la méthylation de l'ADN est le mécanisme le plus fréquemment observé pour réprimer l'expression génique et affecte principalement les gènes suppresseurs de tumeurs. Récemment, l'analyse de l'ensemble du génome de 344 patients atteints de LAM a permis d'identifier des profils de méthylation de l'ADN et de définir de nouveaux facteurs pronostiques avec une nouvelle stratification des patients à risques. Cette signature définit la nature des gènes réprimés par l'hyperméthylation et sont essentiellement des gènes suppresseurs de tumeur, des facteurs de transcription, des protéines d'import nucléaire, des protéines impliquées dans l'apoptose, et des cytokines myéloïdes (*Figuerola, Lugthart et al. 2010; Uribealga, Di Croce et al. 2011*). La mise en évidence de telles modifications épigénétiques est importante dans la prise en charge thérapeutique des patients car elles permettent l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC (Trichostatin A) ou de DNMT (5-azacytidine) utilisés seuls ou en association aux thérapies classiques ou ciblées afin de restaurer l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et d'améliorer la survie de ces patients (*Di Croce, Raker et al. 2002*).

Au vue de l'ensemble des modifications génétiques intervenant dans le processus de leucémogenèse, il ne paraît pas surprenant que des mutations épigénétiques induites par les protéines ADAR (Beghini, Ripamonti et al. 2000; Jiang, Crews et al. 2013) puissent conduire à l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

Ainsi, sur la base de l'ensemble de ces observations, l'objectif de notre travail était de déterminer le rôle de l'édition de l'ARN par les enzymes ADAR dans l'établissement du phénotype tumoral de patients atteints des leucémies aiguës myéloïdes avec caryotype normal. L'identification de mutations ayant pour but de contribuer à une meilleure compréhension du rôle de ces protéines dans la leucémogenèse, d'améliorer la stratification des patients à risques, voire même permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, nous avons dans un premier temps mesuré le niveau d'expression des protéines dans plusieurs types de tumeurs hématopoïétiques à partir de lignées cellulaires humaines. Afin de comparer l'expression des enzymes ADAR des lymphocytes tumoraux avec leur expression dans des lymphocytes B et T sains, nous avons dans un deuxième temps activé *in vitro* des lymphocytes B et T triés à partir de PBMC de donneurs sains. Enfin, nous avons dans un dernier temps, séquencé les transcrits d'ARN de 40 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde avec caryotype normal afin d'identifier de potentiels sites édités par les enzymes ADAR dans le but d'évaluer leur implication dans le développement de cette pathologie.

II MATÉRIEL ET MÉTHODE DE L'ÉTUDE

II.1 OBJECTIFS

II.1.1 Objectif principal

L'objectif principal de cette étude était d'identifier des sites édités par les enzymes ADAR à partir de l'analyse du transcriptome de 40 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde avec caryotype normal.

II.1.2 Objectifs secondaires

Déterminer le rôle de l'édition de l'ARN par les enzymes ADAR dans l'établissement du phénotype tumoral à partir de plusieurs types de tumeurs hématopoïétiques issues de lignées cellulaires humaines.

Déterminer le niveau d'expression des enzymes ADAR dans des lymphocytes B et T sains.

Comparer l'expression des enzymes de lymphocytes B et T en conditions physiologiques avec celle de lymphocytes B et T tumoraux.

II.2 POPULATION ÉTUDIÉE

L'analyse du transcriptome de patients atteints leucémie aiguë myéloïde a été réalisée à partir de moelle osseuse de 40 patients du CHU de Toulouse au diagnostic initial sur une période de 8 ans. Les patients soit 19 femmes et 21 hommes ont été inclus rétrospectivement. Les leucémies aiguës myéloïdes ont été classées selon les critères morphologiques du FAB qui a permis d'individualiser: 13 LAM1 et 13 LAM4, 8 LAM2, 3 LAM5 et 1 LAM6 (**Tableau 2**). Tous avaient un caryotype normal (cytogénétique conventionnelle et FISH). Le statut mutationnel pour *FLT3*, *NPM1*, *CEBP α* , *K-RAS*, *N-RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3*, *CKIT*, *TET2* était recherché par PCR multiplexe et HRM. Des cellules myéloïdes CD33+ issues de la moelle osseuse de deux donneurs sains correspondaient aux témoins.

II.3 MÉTHODE

II.3.1 Analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN (RNA-seq)

Technique réalisée à l'aide de séquenceur nouvelle génération. Elle permet d'obtenir des informations relatives à un fragment transcrit (séquence d'ARN) par le séquençage de l'ADN complémentaire (ADNc). La première étape consiste en une extraction de l'ARN suivie d'une rétrotranscription. L'ADN complémentaire ainsi obtenu est ensuite ligué à des adaptateurs avant d'être amplifié par PCR puis séquencé selon la technique de Sanger qui consiste en

l'incorporation aléatoire des ddNTP marqués via un fluorochrome différent pour chaque nucléotide. L'intégration de ces nucléotides arrête la synthèse du brin d'ADN et produit de la fluorescence détectée par une caméra. Les tracés sont ensuite analysés via un logiciel.

Dans notre étude, l'ARN des patients était extrait avec du Trizol (Ambion, Austin, TX, USA). La concentration de l'ARN était déterminée par dosage spectrophotométrique sur Nanodrop 2000 (ThermoScientific) et leur qualité était analysée sur puce RNA Nano Chips (Agilent Technologies). La reverse transcription était réalisée à l'aide du kit Superscript II reverse transcription (Invitrogen). Le séquenceur employé était un Illumina HiSeq 2000 qui produisait des fragments d'ADNc d'environ 200 pb. La profondeur du séquençage ou « reads » obtenue pour chaque patient était des séquences de 91 nucléotides orientées qui ont été séquencées selon une lecture dite « paired end » c'est-à-dire dans les deux sens. Les séquences ainsi obtenues (soit 91*2) ont ensuite été alignées sur le génome humain de référence hg19, GRCH 37, disponible sur UCSC Genome bioinformatics, à l'aide du logiciel STAR (Spliced Transcript Alignment to a Reference). Les analyses bio-informatiques de RNA-seq ont été réalisées en collaboration avec la plateforme Bioinfo Genotoul à Toulouse.

II.3.2 Identification des sites édité

Les analyses ont ensuite été réalisées avec le logiciel GATK (Genome Analysis Tool Kit) qui détecte les variations d'une seule paire de bases du génome liée au polymorphisme nucléotidique entre individus d'une même espèce (SNP ou Single Nucleotide Polymorphism). Tous les mésappariements répertoriés dans la banque de données des dbSNP ayant été décrites à partir d'ADN génomique ont été éliminées ainsi que les variations A-en-G (et T-en-C pour le brin anti-sens) communes aux patients et aux contrôles. Nous avons fixé une fréquence seuil de mutation pour définir une variation récurrente. Ainsi, les variations retrouvées chez moins de 5 patients ont été éliminées. L'ensemble des variations ont été répertorié à l'aide du programme Variant Effect.

II.4 MATÉRIEL

II.4.1 Culture cellulaire

Plusieurs lignées cellulaires issues de différentes hémopathies malignes humaines ont été utilisées pour cette étude (**Tableau 3**). Toutes les cultures cellulaires ont été réalisées à 37°C à 5% de CO₂ dans leur milieu spécifique supplémenté avec du sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, PAN Biotechnologies), 2mM de L-Glutamine, 1mM de Pyruvate de

sodium et 20µg/ml de Pénicilline/Streptomycine. Trois passages par semaine étaient réalisés afin de rétablir une concentration de $0,2 \cdot 10^6$ cellules/ml.

II.4.2 Collecte et purification de cellules mononuclées issues du sang périphérique (PBMC)

Les PBMC issues de donneurs sains ont été récoltées par gradient de Ficoll après centrifugation. Les lymphocytes B et T étaient triés par séparation magnétique en deux étapes :

1/Sélection positive des lymphocytes B CD19+ à l'aide du kit CD19 MicroBeads human MACS (Miltenyi Biotec) 2/Sélection positive des lymphocytes T CD4+ sur l'ensemble des cellules CD19- à l'aide du kit CD4 MicroBeads human MACS (Miltenyi Biotec). L'analyse des cellules triées a été contrôlée par cytométrie de flux après double immunomarquage anti-CD19 et anti-CD4 (CD19, CD4 human antibodies MACS Miltenyi Biotec)

II.4.3 Conditions de stimulations des lymphocytes B et T

Les lymphocytes B CD19+ ont été stimulés par du lipopolysaccharides (LPS, *Escherichia Coli* O111 :B4 Sigma-Aldrich 3µg/ml) et les lymphocytes T CD4+ par la phytohemagglutinin PHA-M (Lectin from *Phaseolus vulgaris*, Sigma-Aldrich 3µg/ml) dans du milieu de culture RPMI supplémenté en SVF 10% pendant 5 jours permettant l'expression du marqueur CD30 à la surface des cellules. La viabilité cellulaire était analysée à J3 et J5 par comptage des cellules au bleu de trypan sur cellule de Malassez.

II.4.4 Cytométrie en flux

L'expression des marqueurs CD4, CD19, et CD30 sur les différentes lignées cellulaires a été analysée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à différents fluorochromes (Miltenyi Biotec, Germany): isothiocyanate de fluorescéine pour l'anticorps anti-CD4 (CD4-FITC), Allophycocyanin pour l'anticorps anti-CD19 (CD19-APC) et Phycoerythrin pour l'anticorps anti-CD30 (CD30- PE). Les cellules (10^7 cellules) ont été marquées par 10 µl d'anticorps pendant 10 min à 4°C à l'abri de l'obscurité et étaient analysées sur le cytomètre FACS calibur (BD Biosciences) avec le logiciel de traitement des données FlowJo. Le nombre d'évènements analysés était de 10 000 à 40 000 lymphocytes suivant les expériences.

II.4.5 Extraction des protéines

Plusieurs tampons de lyse hypotonique ont été utilisés à froid pour les différentes extractions protéiques : tampon de lyse totale: 20mM Tris-HCl (pH= 7.5), 150mM NaCl, 4mM EDTA, 0.5% Triton 100x, 0.2% SDS, des inhibiteurs de protéases et phosphatases (CIP 1X), 20mM NaF, 2mM Orthovanadate de Sodium, 1mM Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF 1X).

Protocole d'extraction totale:

Les extraits totaux étaient réalisés par lyse de 5.10^6 cellules dans 200 μ l de tampon de lyse totale et étaient conservés à -80°C après sonication.

II.4.6 Dosage des protéines

La concentration en protéines a été déterminée par une méthode colorimétrique basée sur l'acide bicinchoninique (test BCA). Le réactif en présence de protéines forme un complexe pourpre qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 562nm (absorption optique maximale). L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en protéines. Après avoir établi au préalable une gamme étalon à partir d'albumine de sérum bovin, la quantité de protéines obtenue quel que soit la technique d'extraction variait de 1 à 11 *mg/ml*.

II.4.7 Western Blot

Les extraits protéiques (30 μ g) étaient repris dans un tampon de charge (bleu de bromophénol) et dénaturés pendant 15 min à 95°C dans un bain sec. Les protéines étaient séparées par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide (8%) et transférées à 200mA sur une membrane de nitrocellulose Protrans (Whatman, Allemagne) pendant 1h30. Après saturation des membranes par du Phosphate Buffered Saline contenant 0,2% de Tween (PBS-T) et 5% de lait écrémé, les membranes étaient incubées à 4°C sur la nuit avec les anticorps primaires suivants : anti-ADAR1 (H-176), anti-ADAR2 (H-90) (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, France), anti-GAPDH (Millipore). Après trois lavages des membranes avec du PBS-T, les anticorps primaires étaient détectés après incubation avec les anticorps secondaires correspondants : IgG anti-lapin (Jackson ImmunoResearch Beckman Coulter Company, Marseille, France) pour ADAR1 et 2, IgG anti-souris (Jackson ImmunoResearch Beckman) pour GAPDH et révélées après ajout du substrat luminescent Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3 (Sigma-Aldrich, USA).

II.4.8 Extraction d'ARN

L'ARN était extrait selon le protocole de purification des ARN totaux incluant les petits ARN cellulaires commercialisé par Qiagen. Brièvement, 3.10^6 cellules étaient lysées par 700 μ l de Qiazol lysis Reagent (Qiagen®), puis les ARN totaux étaient extraits par du chloroforme et purifiés sur colonne de silice du minikit d'extraction miRNeasy Qiagen®. La concentration de l'ARN était déterminée par dosage spectrophotométrique sur Nanodrop (ThermoScientific) et leur qualité était analysée sur puce RNA Nano Chips (Agilent Technologies).

II.4.9 Reverse Transcription (RT) de l'ARN et réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (quantitative) ou qPCR

L'analyse de l'expression des transcrits des différentes enzymes (ADAR1 p110, ADAR1 p150 et ADAR2) a été effectuée par RT-qPCR en utilisant des sondes commerciales Taqman pour la réaction de PCR (Applied Biosystem, AB). La reverse transcription de l'ARN est réalisée à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) utilisant des « random primers » pour l'initiation de la synthèse d'ADNc efficace pour tout type d'ARN. Les différents ARN (100ng) sont rétro transcrits par la Reverse Transcriptase MultiScribe™ 50U/ μ l sur thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) selon le programme suivant : une étape de 10 min à 25°C nécessaire à l'hybridation des « random primers » suivi d'une étape de 120 min à 60°C pour la synthèse de l'ADN complémentaire (cDNA). La réaction est stoppée par dénaturation de l'enzyme à 85°C pendant 5 min. Les ADNc ont ensuite été amplifiés en présence des sondes ADAR1 p110 Hs 01017596_m1 (5'-GAAGTGCAAGACCCGGGGTATTCCC-3'), ADAR1 p150 Hs 01020780_m1 (5'-TGAATCCGCGGCAGGGGTATTCCCT-3'), ADAR2 Hs 00953724_m1 (5'-GTGCACGGCAAGGTTCCCTCCCACT-3'). La quantification relative par la méthode de comparaison des Ct a permis de comparer les différents échantillons en utilisant l'actine comme référence pour la normalisation. La différence entre les Ct était calculée pour chaque ADNc étudié : $\Delta Ct = Ct(\text{transcrit d'intérêt}) - Ct(\text{transcrit actine})$. L'expression relative des ARNm des enzymes normalisée par rapport à l'actine est estimée par la formule : $2^{-\Delta Ct}$. Le calcul de la différence d'expression d'ADAR1 et d'ADAR2 des lignées par rapport à leur expression dans des lymphocytes B et T non tumoraux était estimé par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La qPCR était réalisée sur le thermocycleur LightCycler 480 (Roche) dans un volume final de 20 μ l contenant 4 μ l de cDNA (produit de la reverse transcription), 1 μ l de sonde Taqman® Gene Expression Assays

Mix 20X, 10 µl de Taqman® Universal PCR Master Mix No Amperase UNG (2X) contenant la Taq polymerase (AB) et 5 µl de RNase-free water. Le programme utilisé pour la qPCR est le suivant : Une étape préliminaire d'activation de l'enzyme de 2 min à 50°C suivi de 10 min à 95°C afin d'assurer une dénaturation totale de l'ADN matriciel, suivi de 45 cycles d'amplification : 15s à 95°C pour dénaturer et 1 min à 60°C pour l'hybridation et l'amplification. Un cycle final de 5 min à 4°C permettait de conserver les produits de la PCR.

Tableau 2 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude

Patient	Sexe	Date du diagnostique	Classification FAB	Mutation ou étiquette moléculaire
P1	F	17/09/2010	M2	NMP1
P2	F	10/09/2010	M1	FLT3-ITD, NMP1
P3	F	20/01/2009	M1	CEBPA, NPM1
P4	F			NMP1
P5	M	06/08/2009	M1	FLT3-ITD, NMP1
P6	F	26/10/2010	M4	DNMT3A, FLT3-ITD, NMP1
P7	M	15/11/2011	M2	FLT3-ITD, NMP1
P8	F	17/09/2010		FLT3-ITD, NMP1
P9	F	18/10/2010	M4	NMP1
P10	F	10/03/2006	M4	N-RAS
P11	F	05/03/2010	M4	NMP1
P12	M	07/01/2009	M5	DNMT3A, NMP1
P13	F	21/04/2006	M4	DNMT3A
P14	F	20/04/2011	M2	Absence de mutation
P15	F	02/02/2005	M4	IDH2
P16	M	22/05/2006	M4	IDH2
P17	F	31/01/2012	M1	FLT3-ITD
P18	F	03/07/2008	M1	FLT3-ITD
P19	M	21/11/2008	M2	FLT3-ITD
P20	M	06/03/2008	M4	FLT3-ITD
P21	M	14/09/2008	M1	FLT3-ITD
P22	M	21/03/2011	M4	Absence de mutation
P23	M	30/07/2008	M1	Absence de mutation
P24	M	26/04/2004	M1	KIT, TET-2
P25	M	07/04/2010	M1	CEBPA
P26	F	22/07/2008	M1	FLT3-ITD, TKD
P27	M	28/11/2007	M1	FLT3-ITD
P28	M	14/03/2010	M2	Absence de mutation
P29	M	17/07/2008	M4	IDH2
P30	F	14/11/2008	M2	DNMT3A, FLT3-ITD, NMP1
P31	F	28/07/2010	M5	NMP1
P32	M	27/04/2010	M2	CEBPA
P33	M	05/12/2008	M5	Absence de mutation
P34	M	25/11/2008	M4	IDH2, N-RAS
P35	F	07/12/2007	M1	FLT3-ITD
P36	M	02/07/2010	M6	Absence de mutation
P37	M	29/11/2010	M2	Absence de mutation
P38	M	07/11/2011	M4	Absence de mutation
P39	F	07/04/2008	M4	Absence de mutation
P40	M	30/04/2008	M1	CEBPA

Tableau 3 : Phénotype et conditions de culture des lignées humaines issues de différentes hémopathies malignes

Type	Milieu	Phénotype		
Lymphome B		CD4	CD19	CD30
DEAU	IMDM 20% SVF	-	+	-
RL	RPMI 10% SVF		+	-
OCI Ly8	IMDM 20% SVF		+	-
REC-1	RPMI 10% SVF	-	+	-
Raji	RPMI 10% SVF	-	+	-
DG75	RPMI 10% SVF	-	+	-
PASC	IMDM 20% SVF	-	+	-
Lymphome T				
DEGLIS:	IMDM 20% SVF	-	+	+
HSB-2	RPMI 10% SVF	-	-	+
Lymphome anaplasique à cellules T				
SU-DHL-1	ISCOVE 20% SVF	-	-	+
COST	ISCOVE 20% SVF	-		+
KARPAS 299	IMDM 20% SVF	+	-	+
FEPD	IMDM 20% SVF	+	-	+
Mac2A	IMDM 20% SVF	-		+
Leucémie				
Leucémie aigüe lymphoblastique B				
VAL	RPMI 10% SVF		+	+
Nalm6	RPMI 10% SVF	-	+	+
REH	RPMI 10% SVF	-	+	-
Leucémie aigüe lymphoblastique T				
CEM ATCC CCL 119	RPMI 10% SVF	+	-	+
JURKAT	RPMI 10% SVF	-	-	+
Leucémie aigüe myéloïde				
HL-60	IMDM 20% SVF	+	-	+
NB4	RPMI 10% SVF	+	-	+
Leucémie lymphoïde chronique		CD4	CD19	CD30
Mec2	IMDM 20% SVF	-	+	+
Cancer du col de l'utérus				
HeLa	EMEM 10% SVF			-

III RESULTAT

III.1 ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 DANS DIFFERENTES HEMOPATHIES MALIGNES :

III.1.1 Profils d'expression des protéines ADAR en Western blot (WB) dans des lignées de lymphome et de leucémies

Afin de réaliser notre objectif, nous avons dans un premier temps analysé les profils d'expression des protéines dans différentes lignées cellulaires de lymphomes et de leucémies.

III.1.1.1 Analyse dans les lymphomes B et T

L'analyse en Western Blot des lignées de lymphome B mettait en évidence la présence d'ADAR1 p110 et d'ADAR2 pour l'ensemble d'entre elles avec néanmoins quelques différences (**Figure 11**). En effet, nous détectons davantage ADAR1 p110 dans la lignée Mec2 (lignée de leucémie lymphoïde chronique LLC) et davantage d'ADAR2 dans deux lignées de lymphome B diffus grandes cellules sur les cinq étudiées (Deau, OCI-Ly8 C3). Par ailleurs, bien que la plupart de ces lignées exprimaient différentes isoformes d'ADAR2 et d'ADAR1 p110, seul Mec2, exprimait l'isoforme ADAR1 p150.

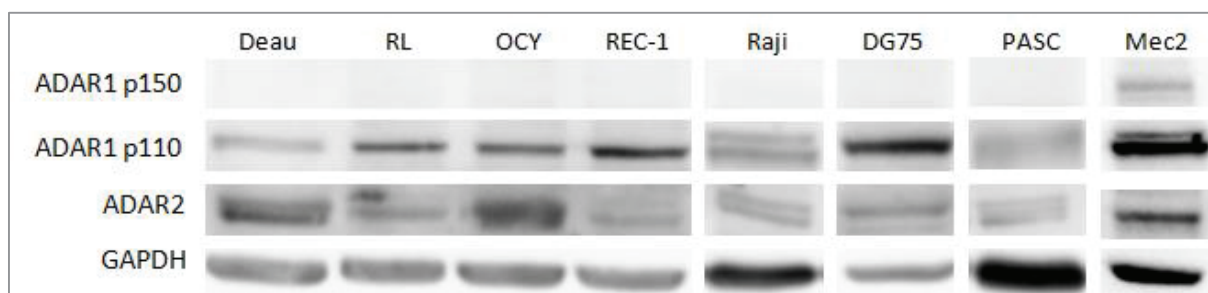


Figure 11. Analyse de l'expression des enzymes ADAR dans des lignées de lymphomes B humaines

Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans : des lignées lymphome B diffus grandes cellules (Deau, RL, OCI-Ly8, REC-1, PASC), lymphome de Burkitt (Raji, DG75), LLC (Mec2). Le niveau d'expression du GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge.

Dans les lignées de lymphome T (**Figure 12**) on ne détectait également pas l'isoforme ADAR1 p150. Par contre, ADAR1 p110 ainsi qu'ADAR2 étaient présentes avec comme précédemment des niveaux d'expression différents. En effet, ADAR1 p110 semblait moins exprimée dans les lignées de lymphome anaplasique à grandes cellules T (ALCL) portant la translocation t(2;5)(NPM-ALK+) (SU-DHL-1, COST, KARPAS 299) que dans les lignées de même type histopathologique mais ne portant pas cette translocation (FEPD, MAC2A), et n'exprimant donc pas la tyrosine kinase ALK. Par ailleurs, nous avons observé que les lignées

de lymphome T exprimaient moins d'isoformes des protéines ADAR1 et ADAR2 que les lignées de lymphome B, puisque seule HSB-2 présentait des isoformes de la protéine ADAR1 p110.

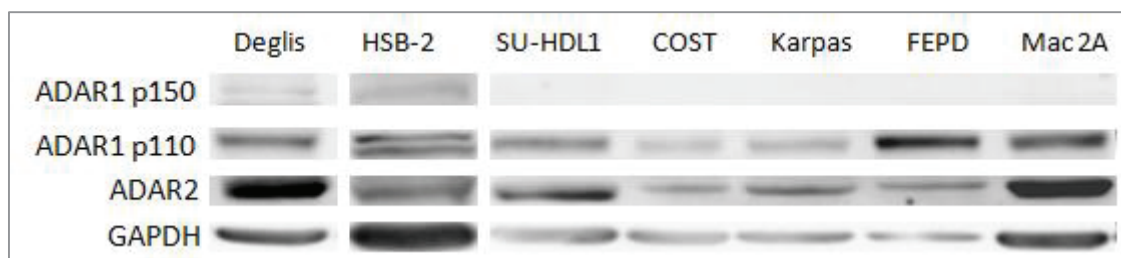


Figure 12. Analyse de l'expression des enzymes ADAR dans des lignées de lymphomes T humaines

Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans des lignées de lymphome T de phénotype mixte B/T (Deglis), lymphome T dérivée de leucémie aigüe lymphoblastique T (HSB-2), ALCL dont 3 NMP-ALK+ (SU-HDL-1, COST, Karpas) et 2 NMP-ALK-(FEPD, Mac2A). Le niveau d'expression du GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge.

III.1.1.2 Analyse dans les leucémies aigues : LAL et LAM

L'analyse des protéines ADAR était différente en fonction du type de leucémies aigües. En effet, alors que l'on détectait les protéines ADAR1 et ADAR2 dans les lignées de leucémies aigües lymphoblastiques T (LAL-T) (**Figure 13A**) et de leucémies aigües myéloïdes (LAM) (**Figure 13B**), on ne les observait pas systématiquement dans les lignées de leucémies aigües lymphoblastiques B (LAL-B) (**Figure 13C**). En effet dans les LAL-B, REH n'exprimait pas ADAR1 p110, tandis que Nalm6 n'exprimait pas ADAR2. Comme observé précédemment dans les lymphomes, la plupart de nos lignées de leucémies n'exprimaient pas l'isoforme interféron inducible d'ADAR1 (ADAR1 p150). Seule la lignée cellulaire VAL, lignée de LAL-B, semblait l'exprimer à un niveau très faible.

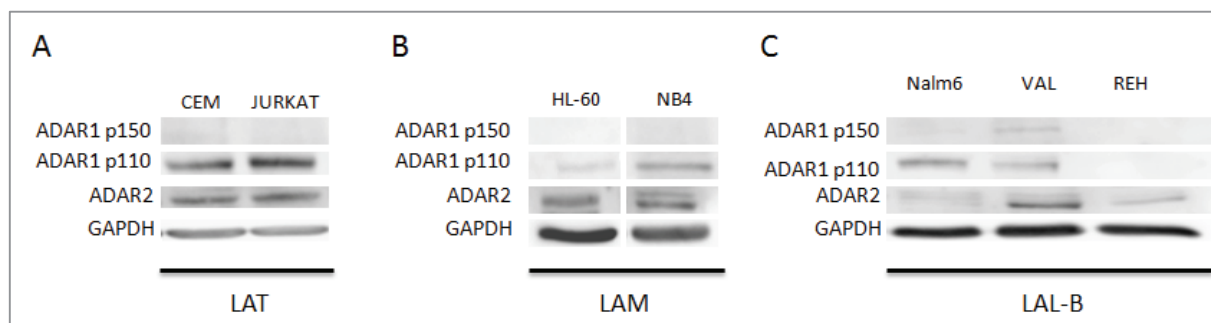


Figure 13. Analyse de l'expression des enzymes ADAR dans différentes lignées leucémiques humaines

A/ Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans les lignées de LAT (CEM, JURKAT)

B/ Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans les lignées de LAM (HL-60, NB4)

C/ Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans les lignées de LAL-B (Nalm6, VAL, REH). Le niveau d'expression du GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge (A, B, C).

III.1.2 Profil d'expression des ARNm des enzymes ADAR par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) dans les lymphomes et les leucémies

III.1.2.1 Analyse dans les lymphomes B et T

Dans un deuxième temps nous avons analysé les profils d'expression de leurs ARN messagers par qRT-PCR. D'une façon générale, les résultats de qRT-PCR montraient que les profils d'expression des ARN messagers *ADAR1 p110* et *ADAR1 p150* étaient similaires quel que soit le type de lymphome (B ou T) avec une plus forte expression de l'ARNm d'*ADAR1 p110* (**Figure 14 et 15**). Bien que le niveau d'expression d'*ADAR1 p110* soit supérieur, son expression relative par rapport à l'actine était faible, hormis certaines lignées comme Raji et DG75 (lymphome de Burkitt), ou COST (ALCL NPM-ALK+) qui l'exprimaient davantage. L'expression d'*ADAR2* quant à elle, différait entre lymphome B et lymphome T. En effet, alors qu'*ADAR2* ne semblait pas exprimée dans nos lignées de lymphomes B, on détectait à l'inverse une très faible expression de son ARNm dans toutes nos lignées de lymphomes T.

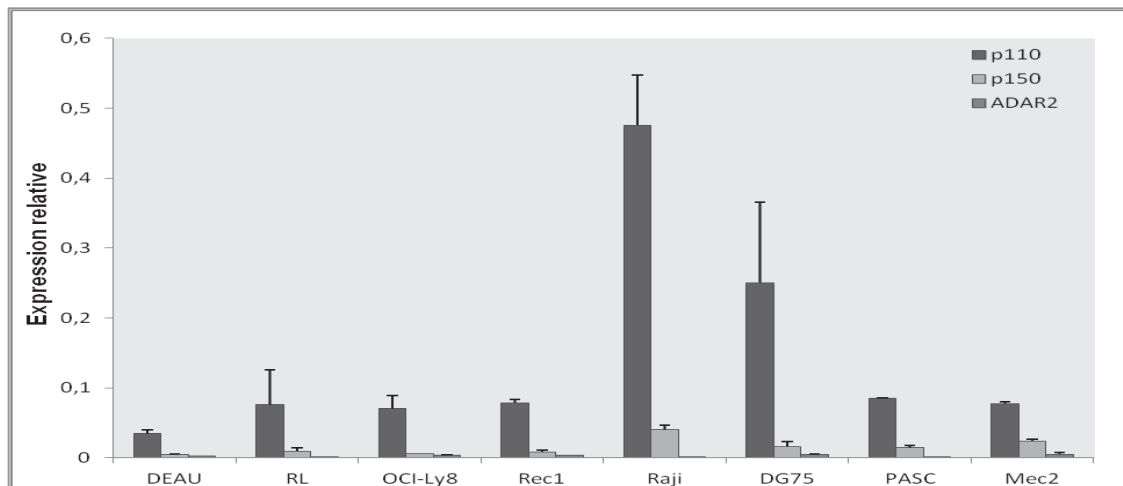


Figure 14 Niveau d'expression d'ADAR1 et ADAR2 dans les lignées de lymphome B par qRT-PCR

Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans des lymphomes B. L'axe (y) représente l'expression relative des ARNm d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 normalisée par rapport au contrôle interne (actine) et estimée par la formule : $2^{-\Delta Ct}$. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs.

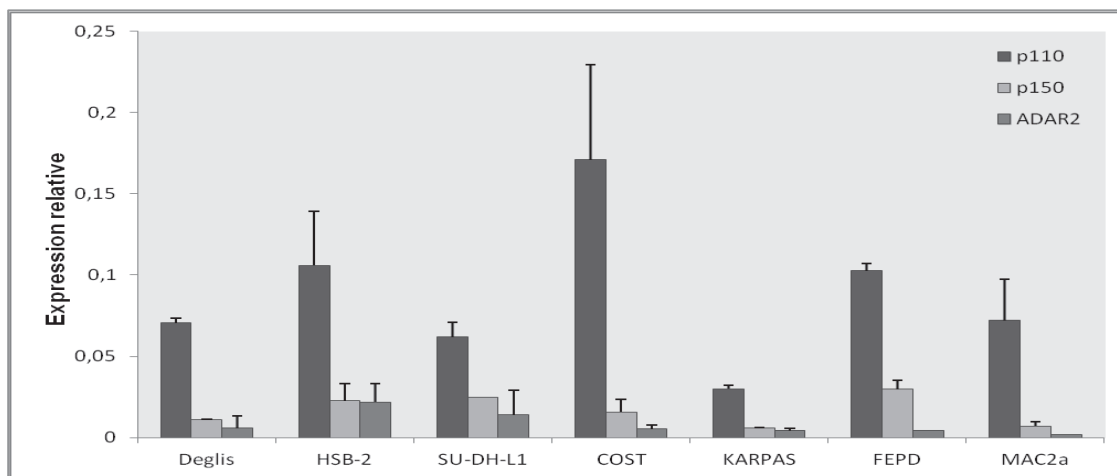


Figure 15. Niveau d'expression d'ADAR1 et ADAR2 dans les lignées de lymphome T par qRT-PCR

Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans les lymphomes T. L'axe (y) représente l'expression relative des ARNm d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 normalisée par rapport au contrôle interne (actine) et estimée par la formule : $2^{-\Delta Ct}$. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs.

III.1.2.2 Analyse dans les leucémies aiguës : LAL et LAM

Dans les lignées de leucémies, les résultats de la qRT-PCR (**Figure 16**) mettaient en évidence, comme précédemment, une plus forte expression pour *ADAR1 p110* suivie de l'expression d'*ADAR1 p150* et d'*ADAR2*. Les ARNm des ADAR étaient par ailleurs, exprimés dans les mêmes proportions qu'il eut s'agit d'une LAL B ou T, ou d'une LAM. Seule HL-60, lignée de leucémie aigüe myélomonocytaire (type LAM) présentait une expression d'*ADAR1 p110* jusqu'à trois fois supérieure par rapport aux autres lignées de leucémie.

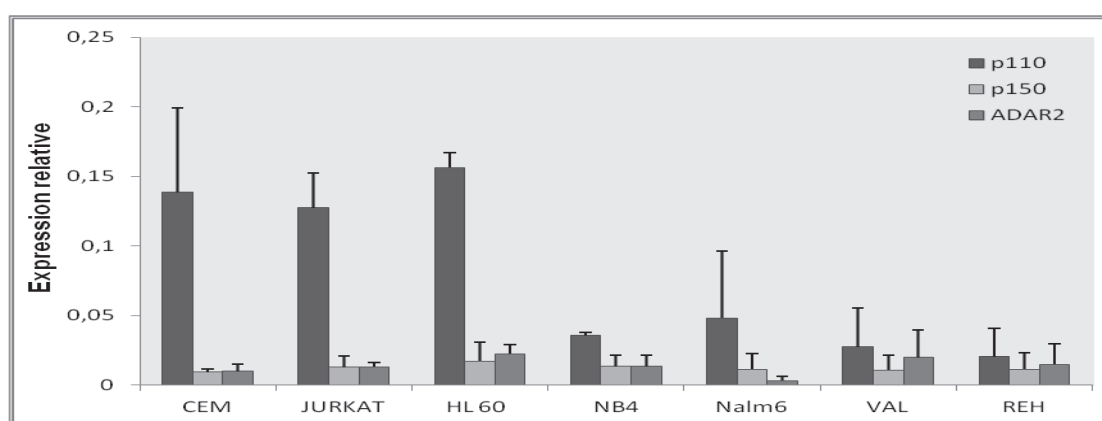


Figure 16. Niveau d'expression d'ADAR1 et ADAR2 dans les lignées de leucémies aiguës par qRT-PCR

Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* dans LAL-T (n=2) (CEM, JURKAT), LAM (n=2) (HL-60, NB4), LAL-B (n= 3) (Nalm6, VAL, REH). L'axe (y) représente l'expression relative des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* normalisée par rapport au contrôle interne (actine) et estimée par la formule : $2^{-\Delta Ct}$. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs.

Ainsi, au vue de l'ensemble des résultats, nous avons pu mettre en évidence que les enzymes ADAR étaient exprimées dans les lymphomes B ou T ainsi que dans les leucémies aiguës. L'isoforme ADAR1 p150 n'était quant à elle exprimée que pour deux de nos lignées : Mec2 (lignée de leucémie lymphoïde chronique LLC) et VAL (lignée de LAL-B).

III.2 ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 EN CONDITION BASALE PUIS ACTIVEE DANS DES LYMPHOCYTES B CD19+ ET DES LYMPHOCYTES T CD4+

III.2.1 Principes de l'activation des lymphocytes B et T in vitro

Afin de comparer l'expression des enzymes ADAR des lymphocytes tumoraux avec leur expression dans des lymphocytes B et T sains, nous avons activé *in vitro* des lymphocytes. Les lymphocytes tumoraux, présentant de multiples marqueurs de surface, reflet des différents états d'activation pour ces cellules, nous avons activés des lymphocytes B et T triés à partir de PBMC de donneurs sains afin d'obtenir de meilleurs contrôles. Sur l'ensemble des cellules triées, seulement 2/3 des lymphocytes B et T ont été mis en culture et sous activation. Le tiers restant de lymphocytes B et T était lysé dès la fin du tri magnétique afin d'analyser le niveau d'expression des enzymes ADAR dans des lymphocytes contrôles non stimulés. L'activation antigénique des lymphocytes B était réalisée par les lipopolysaccharides (LPS), composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS, structure antigénique reconnue par le Toll like-receptors 4 (TLR4) à la surface des lymphocytes B induit une réponse immunitaire indépendante des lymphocytes T (Rawlings, Schwartz et al. 2012). Les lymphocytes T ont été activés par la phytohématogglutinine (PHA), lectine mitogène. L'activation des lymphocytes B et T nous a permis d'induire l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, des transformations morphologiques, la production de cytokines et l'apparition de marqueurs membranaires d'activation tel que le CD30. Ces lymphocytes une fois stimulés se rapprochaient davantage des conditions dans lesquelles se trouvaient les lymphocytes tumoraux de nos lignées, et ce notamment du fait de l'acquisition de nouveaux marqueurs de surface comme le CD30. Ce récepteur, exprimé à la surface des cellules de Reed-Sternberg dans les lymphomes de Hodgkin, sur les cellules des lymphomes anaplasiques à grandes cellules T, sur lymphocytes B et T (CD4 et CD8) activés et sur la plupart nos lignées (**Tableau 2**), nous a permis de comparer l'expression des enzymes ADAR des lymphocytes B et T CD30+ en conditions physiologiques (donneur sain) avec celle en conditions pathologiques (lignée tumorale).

III.2.2 Analyse de l'activation des lymphocytes B et T in vitro

L'activation des lymphocytes B et T a été réalisée sur une durée de 5 jours pendant laquelle nous avons observé des modifications morphologiques témoignant de leur activation: présence d'amas cellulaires, prolifération cellulaire, perte du marqueur membranaire CD19 pour les lymphocytes B témoin de leur différenciation terminale et acquisition du récepteur de surface CD30 pour 50% des lymphocytes B et 7% des lymphocytes T (**Figure 17**). Ainsi, après

5 jours d'activation, nous avons extrait les protéines ADAR des lymphocytes B et T afin d'analyser leurs niveaux d'expression.

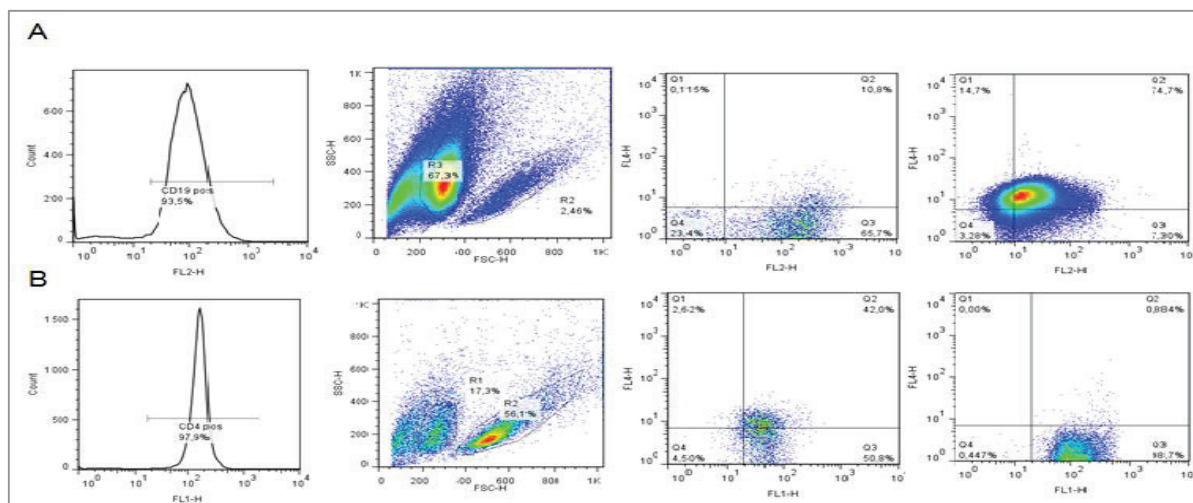


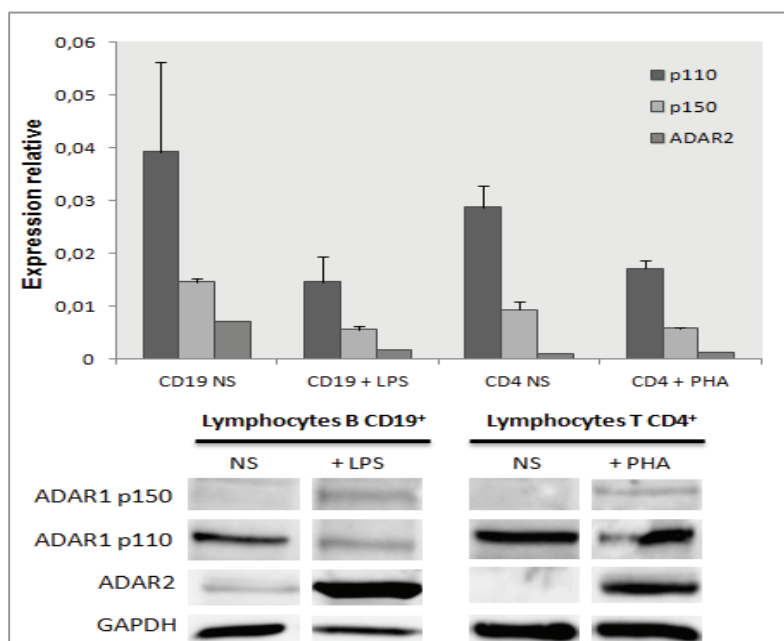
Figure 17. Analyse par cytométrie en flux de l'acquisition du marqueur membranaire CD30 à la surface des lymphocytes B et T après activation

La population lymphocytaire a été sélectionnée selon la granulométrie Side Scatter (SSC), axe (y) et la taille, axe (x) Forward scatter (FSC). A/ panel supérieur gauche: analyse après tri magnétique des CD19+ marquées par l'anticorps monoclonal CD19-APC. Après activation, analyse par double marquage des lymphocytes anti CD19-APC et anti CD30-PE. A/ Panel supérieur droit : La région R2 correspond à la population cellulaire CD19^{high} CD30^{low}, la région R3 correspond à la population cellulaire CD19^{low} CD30^{high}, l'axe (y) correspond aux cellules marquées CD30-PE, l'axe des (x) correspond aux cellules marquées CD19-APC. B/ panel inférieur gauche: Analyse après tri magnétique des CD4+ marquées anti-CD4-FITC. Après activation, analyse par double marquage des lymphocytes par anti CD4-FITC et anti CD30-PE. B/ Panel inférieur droit : La région R1 correspond à la population cellulaire CD4^{low} CD30^{high}, la région R2 correspond à la population cellulaire CD4^{high} CD30^{low}, l'axe (y) correspond aux cellules marquées CD30- PE, l'axe (x) correspond aux cellules marquées CD4-FITC.

III.2.3 Niveaux d'expression des enzymes ADAR dans les lymphocytes B et T dans différentes conditions expérimentales

Au vue de nos résultats, les lymphocytes B et T en conditions basales (non stimulés) exprimaient ADAR1 p110 et ADAR2 mais n'exprimaient pas ADAR1 p150 (**Figure 18**). Cependant, après activation, nous avons observé des modifications majeures de leurs expressions avec notamment une faible expression d'ADAR1 p150, la surexpression de la protéine ADAR2 et à l'inverse une diminution de l'isoforme ADAR1 p110. En parallèle, l'analyse par qRT-PCR a montré une diminution globale de tous les ARNm des ADAR après activation dans les lymphocytes B et T (**Figure 18**).

A /



B/

Figure 18. L'activation des lymphocytes B CD19+ et des lymphocytes T CD4+ modifie l'expression des ARN messagers et des protéines ADAR

A/ Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* dans des lymphocytes B CD19+ avant (ns) et après stimulation (+LPS), et dans des lymphocytes T CD4+ avant (ns) et après stimulation (+PHA). L'axe (y) représente l'expression relative des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* normalisée par rapport au contrôle interne (actine) et estimée par la formule : $2^{-\Delta Ct}$. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs. B/ Analyse par Western Blot du niveau d'expression d'ADAR1 p150, ADAR1 p110 et ADAR2 dans des lymphocytes B CD19+ et des lymphocytes T CD4+ avant et après stimulation. Le niveau d'expression du GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge.

III.2.4 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes sains et des lymphocytes tumoraux

Afin d'établir si l'expression des enzymes ADAR différait entre des lymphocytes sains activés et des lymphocytes transformés, nous avons comparé leurs niveaux d'expression dans lignées cellulaires avec celle des lymphocytes sains activés. Du fait des différents phénotypes entre les lignées (**Tableau 2**) au sein d'une même pathologie, nous avons comparé les lignées CD30+ aux lymphocytes activés. Ainsi les lignées de lymphome B et de LAL-B ont été comparées à des lymphocytes CD19+ CD30+ tandis que les lignées de lymphome T et de LAL-T aux lymphocytes CD4+ CD30+.

III.2.4.1 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes B sains et des lymphocytes B tumoraux

L'analyse du niveau d'expression des ARNm des enzymes par qRT-PCR montrait une globale surexpression d'*ADAR1* et *ADAR2* dans les lignées de lymphomes B et de LAL-B par rapport aux lymphocytes non tumoraux (**Figure 19**). En effet, on observait une augmentation de 5 à 20 fois supérieure pour l'ARNm d'*ADAR1 p110* en fonction des lignées de lymphome B et une augmentation 25 fois supérieure pour l'ARNm d'*ADAR2* dans la lignée de LAL-B Nalm6.

III.2.4.2 Comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre des lymphocytes T sains et des lymphocytes T tumoraux

Dans les lymphomes T et les LAL-T, tous les ARNm des ADAR étaient surexprimés par rapport aux lymphocytes T sains activés. Cette surexpression semblait davantage homogène entre les enzymes puisque l'ARNm d'*ADAR2* équivalait à celui d'*ADAR1 p110*. Nous avons observé toutefois dans la lignée COST (ALCL NPM-ALK+) une expression d'*ADAR1 p110* plus de 30 fois supérieure à celle de lymphocytes T activés (**Figure 20**).

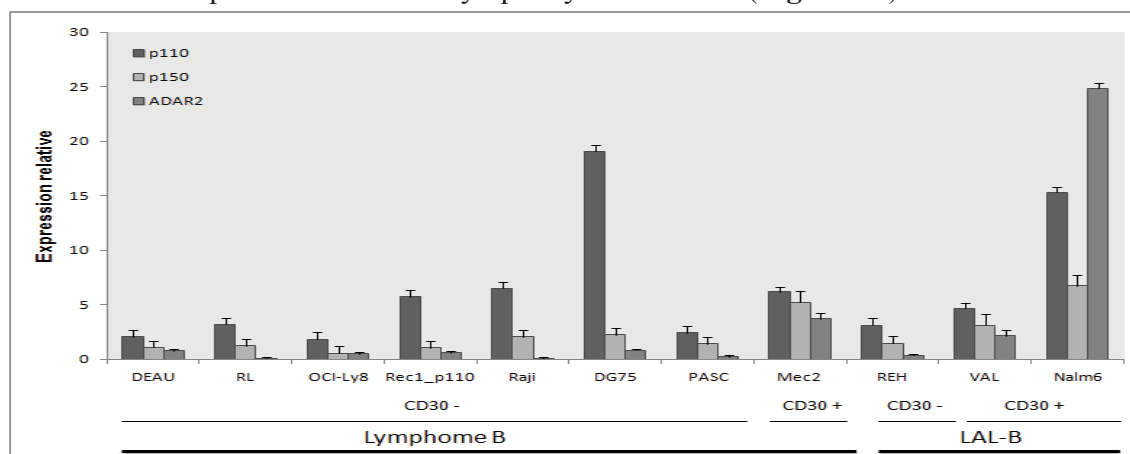


Figure 19. Surexpression des ARN messagers des enzymes ADAR dans les lignées humaines de lymphome B et de LAL-B

Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* dans des lymphomes B CD19+ CD30- et CD19+ CD30+ (Tableau2) lymphome B diffus grandes cellules (Deau, RL, OCI-Ly8, REC-1, PASC), lymphome de Burkitt (Raji, DG75), LLC (Mec2) et dans les LAL-B CD19+ CD30+ (Nalm6, VAL, REH). L'axe (y) représente le facteur d'augmentation entre l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* des lignées estimée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les lignées de phénotypes CD19+ CD30- sont comparées aux lymphocytes B non activés CD30-. Les lignées de phénotype CD19+ CD30+ sont comparées aux lymphocytes B activés CD30+. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs.

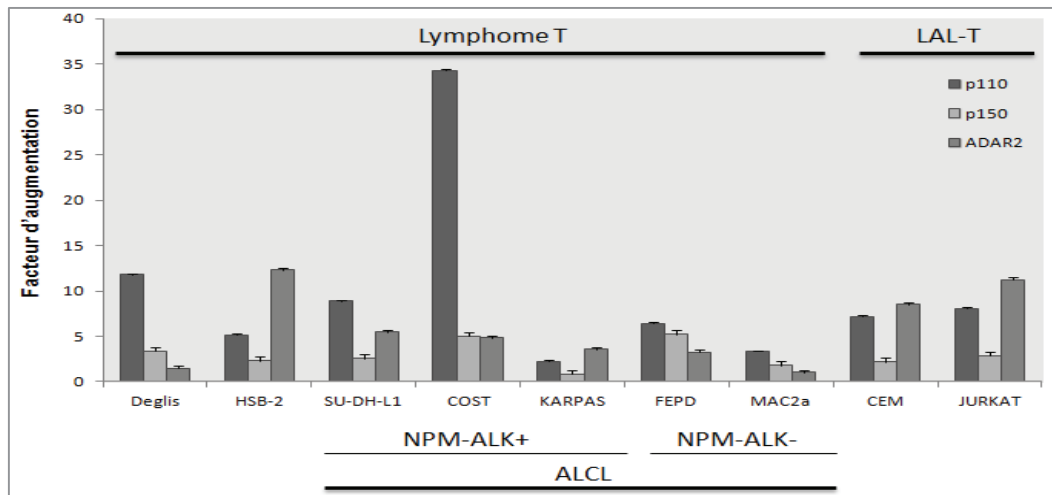


Figure 20. Surexpression des ARN messagers des enzymes ADAR dans les lignées humaines de lymphome T et de LAL-T

Analyse par qRT-PCR de l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* dans les lignées de lymphome T : phénotype mixte B/T (Deglis), lymphome T dérivée de leucémie aigüe lymphoblastique T (HSB-2), ALCL dont 3 NPM-ALK+ (SU-DH-L1, COST, Karpas) et 2 NPM-ALK- (FEPD, Mac2A) et de LAL-T (CEM, JURKAT). Les lignées de lymphome T et de LAL-T étant toutes CD30+, elles sont comparées aux lymphocytes T activés CD30+. L'axe (y) représente le facteur d'augmentation entre l'expression des ARNm d'*ADAR1 p150*, *ADAR1 p110* et *ADAR2* des lignées estimée par la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les écarts-types sont représentés par les barres d'erreurs.

Au vue de l'ensemble de ces résultats, nous avons pu mettre en évidence qu'il semblait exister un mécanisme de régulation de l'expression des enzymes ADAR après activation des lymphocytes B et T en conditions non tumorales. D'autre part, nous avons observé une surexpression d'*ADAR1 p110* dans les lymphomes B (principalement dans les lignées de lymphome de Hodgkin) et les LAL-B ainsi qu'une surexpression d'*ADAR1 p110*, *ADAR1 p150* et *ADAR2* dans les lymphomes T (principalement dans les lignées de lymphome anaplasique grandes cellules avec la translocation NPM-ALK) et les LAL-T.

III.3 ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DE 40 PATIENTS AVEC LAM A CARYOTYPE NORMAL: RECHERCHE DE SITES EDITES

Après avoir confirmé dans un premier temps l'expression des enzymes ADAR dans les hémopathies malignes, nous souhaitions déterminer dans un second temps si elles avaient un rôle dans le développement de ces pathologies par l'analyse du transcriptome de 40 patients atteints de LAM avec caryotype normal.

III.3.1 Identification de sites édités chez des patients atteints de LAM avec caryotype normal

Pour l'analyse des données du séquençage de l'ARN (RNA-seq), nous avons dans un premier temps alignés les séquences de RNA-seq de chaque patient et des contrôles sur le génome humain de référence hg19, GRCH 37, disponible sur UCSC Genome bioinformatics à l'aide du logiciel STAR (Spliced Transcript Alignment to a Reference). Nous avons ensuite recherché les variations d'une seule paire de bases du génome liée au polymorphisme nucléotidique entre individus d'une même espèce (SNP ou polymorphisme d'un seul nucléotide) à l'aide du logiciel GATK (Genome Analysis Tool Kit) afin d'éliminer les variations A-en-G et T-en-C (brin anti-sens) communes aux patients et aux contrôles. Toutes les variations répertoriées dans la banque de données des dbSNP ayant été décrites à partir d'ADN génomique ont été éliminées.

Dans un second temps nous avons fixé une fréquence seuil de mutation afin de définir une variation récurrente. Ainsi, les variations qui ont été retrouvées chez moins de 5 patients ont été éliminées. Enfin nous avons répertorié à l'aide du programme Variant Effect l'ensemble des variations A-en-G avec leur position chromosomique déterminée et annotée, leur localisation, les gènes impliqués ainsi que leurs conséquences potentielles. L'ensemble des données obtenues ont été classées en fonction de leurs conséquences biologiques sur les régions 3'UTR, les microARN mature, les sites d'épissage et les séquences codant pour des protéines.

III.3.2 Bilan des analyses bioinformatiques

Pour chacune des mutations identifiées, le logiciel IGV (Integrative Genomics Viewer) nous a permis de visualiser des séquences orientées de 91 nucléotides pour chaque patient, leur nombre et leur type de séquence à une position chromosomique donnée. Les principales conséquences observées ont été classées selon la région concernée à savoir : régions non codantes et régions codantes.

III.3.2.1 Analyse dans les séquences non codantes

Pour les séquences non codantes, nous avons focalisé notre attention sur les variations pouvant induire des modifications du 3'UTR au niveau de sites prédits ou validés de fixation de microARN, les changements de séquences de microARN mature et la création ou la délétion de sites d'épissage. Pour l'analyse des 3'UTR et des microARN nous avons utilisé le site targetscan qui répertorie les cibles des microARN ainsi que leurs sites de fixation. Les substitutions A-en-G au niveau de ces régions ne nous ont pas permis d'objectiver de modification au niveau des sites de fixation de microARN compris dans les 3'UTR ni même au niveau de séquence de microARN mature. De même, l'analyse des mutations localisées au niveau de sites d'épissage n'a pas permis d'observer la création ou la destruction de sites chez ces patients.

III.3.2.2 Analyse dans les séquences codantes

Pour l'analyse des mutations observées au niveau des séquences codantes pour des protéines nous les avons séparées en mutation non-sens versus mutation faux sens. Dans la mutation non-sens, la substitution nucléotidique induit le changement d'un codon codant pour un acide aminé par un codon stop à l'origine d'une protéine tronquée souvent non fonctionnelle. La mutation faux-sens induit quant à elle un changement d'acide aminé et modifie la protéine. L'analyse des substitutions induisant une mutation faux-sens a été observée sur trois gènes : *ANKRD36* (ankyrin repeat domain 36), *COG3* (décrite dans RADAR) (component of oligomeric golgi complex 3) et *ITSN2* (intersectin 2) qui ont été éliminées en raison de la présence de ces mêmes mutations et dans le même ordre de grandeur chez les deux contrôles. Les substitutions même sens ont été identifiées sur 13 gènes (*CDK11A*, *NADK*, *ALMS1*, *IGFBP2*, *RPL29*, *TSPYL1*, *RIC8A*, *RBM23*, *ACINI*, *IST1*, *NR1H2*, *CTSA*, *NCOA3*), tous impliqués dans le cycle cellulaire ou le métabolisme. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de transcrit présentant de perte ou de gain en codon stop. D'autre part, nous avons également vérifié pour tous les patients à l'aide du logiciel IGV l'édition du transcrit *PTPN6* comme décrit dans l'étude de Beghini *et al* sur des patients atteints de LAM (Beghini, Ripamonti *et al.* 2000). Aucun transcrit édité de *PTPN6* n'a été mis en évidence sur l'ensemble de nos patients.

III.3.3 Analyse du niveau d'expression des enzymes ADAR chez les 40 patients

Enfin nous avons dans un dernier temps comparé le niveau d'expression des enzymes ADAR entre les patients et les contrôles. Aucune différence significative du niveau d'expression d'*ADAR1* ou *ADAR2* n'a été mise en évidence entre les patients et les témoins à l'exception de deux patients pour lesquels l'expression d'*ADAR1* était significativement plus élevée. Pour ces patients, l'augmentation d'expression d'*ADAR1* était par ailleurs corrélée à une plus forte expression de gènes impliqués dans l'inflammation (*IFNGR2*, *STAT1*, *CCL2*, *STAT4*, *EIF2AK*) conformément à ce qui a déjà été décrit dans la littérature (*Yang, Luo et al. 2003; Jiang, Crews et al. 2013*)

Au vue de l'ensemble de ces résultats, nous avons pu mettre en évidence l'existence de sites potentiellement édités dans le transcriptome de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique avec caryotype normal. Pourtant, bien que l'édition ait concerné des séquences codantes et non codantes, aucune de ces mutations ne pouvaient être impliquées dans le développement de leur pathologie. De même, seul deux patients présentaient une augmentation d'expression d'*ADAR1* statistiquement significative.

IV DISCUSSION

IV.1 NIVEAU D'EXPRESSION DES ENZYMES ADAR1 ET ADAR2 DANS DIFFERENTES HEMOPATHIES MALIGNES :

Dans la première partie de notre travail, nous avons analysé les profils d'expression des enzymes ADAR dans des lignées cellulaires issus de patients atteints de lymphome et de leucémie. Nos lignées cellulaires de lymphome étaient des lymphomes malins non Hodgkinien (LMNH), ils correspondent à des proliférations monoclonales malignes de cellules lymphoïdes matures (au même titre que les leucémies lymphoïdes chroniques) dont le point de départ est périphérique (ganglionnaire). Les LMNH, sont représentés par une très grande diversité de tumeurs. Celles-ci sont classées en entités clinico-biologiques de pronostic très différent (classification OMS). Ils se distinguent donc des leucémies aiguës qui se caractérisent par la prolifération monoclonale de progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes avec blocage de la différenciation.

IV.1.1 Synthèse des résultats de Western Blot et de qRT-PCR

Nos résultats montrent que les protéines ADAR1 et ADAR2 sont bien exprimées dans les lignées de lymphome B et T et de leucémies aiguës avec pour certaines la présence d'isoformes de ces protéines. Cependant, l'isoforme d'ADAR1 interféron inducible est principalement absente ou sous exprimée dans ces lignées. Pourtant, d'après les données bibliographiques, il existe une surexpression de l'ARN messager d'*ADAR1 p150* dans les LAL-B de l'enfant (*Ma, Chong et al. 2011*) ainsi que pour les patients atteints de LMC évoluant vers la transformation blastique (*Jiang, Crews et al. 2013*). Les hémopathies malignes étant associées à des processus inflammatoires majeurs, l'absence d'expression d'ADAR1 p150 est probablement liée à l'absence d'activation dans nos conditions expérimentales par interféron γ ou du fait d'une mutation au niveau de son promoteur dans les lignées cellulaires.

L'analyse des résultats de l'expression des ARN messagers des enzymes ADAR montre que toutes les enzymes sont exprimées avec toutefois une surexpression *ADAR1 p110* par rapport aux autres et ce quel que soit le type d'hémopathie maligne.

IV.1.2 Bilan après activation lymphocytaire : comparaison du niveau d'expression des enzymes ADAR entre les lymphocytes sains et les lymphocytes tumoraux

L'activation des lymphocytes B et T nous a permis de comparer l'expression des enzymes dans les lymphocytes tumoraux des lignées avec celle des lymphocytes sains. Ainsi, nous avons observé une diminution d'expression de tous les ARN messagers des enzymes ADAR dans les lymphocytes sains après activation suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation en conditions d'activation non pathologique, qui restent à déterminer. D'autre part, contrairement aux données bibliographiques sur les cancers solides où il est classiquement décrit une globale diminution d'expression des enzymes (*Hochberg, Gilead et al. 2013; Paz, Levanon et al. 2007*), notre travail nous a permis au contraire, de mettre en évidence une globale surexpression des ARN messagers des enzymes ADAR. En effet, nous avons mis en évidence une surexpression d'*ADAR1 p110* dans les lymphomes B (principalement dans les lignées de lymphome de Burkitt) et les LAL-B ainsi qu'une surexpression d'*ADAR1 p110*, *ADAR1 p150* et *ADAR2* dans les lymphomes T (principalement dans les lignées d'anaplasiques grandes cellules avec la translocation NPM-ALK) et les LAL-T. Cette surexpression est par ailleurs en accord avec les données de la littérature sur les leucémies aiguës (*Ma, Chong et al. 2011*).

IV.2 IDENTIFICATION DE SITES ÉDITÉS CHEZ 40 PATIENTS AVEC LEUCÉMIE AIGUË MYÉLOBLASTIQUES AVEC CARYOTYPE NORMAL

L'existence de sites édités a été découverte de manière fortuite en comparant des séquences d'ADN complémentaire (ADNc) à des séquences d'ADN génomique (ADNg). En effet, l'édition induit la substitution d'une adénosine en inosine sur l'ARNm. En s'appariant à une cytosine, l'inosine est donc transcrite en guanosine. Ainsi, la comparaison de marqueurs de séquences exprimées (EST ou expressed sequence tag) qui sont de courtes portions séquencées d'un ADN complémentaire, avec les séquences génomiques ont permis de visualiser un G sur l'ADNc à la place d'un A sur l'ADNg et c'est cette différence qui est retenue comme critère d'édition (*Wulff, Sakurai et al. 2011*). L'émergence du séquençage automatisé de l'ADN couplé aux analyses bioinformatiques ont permis d'identifier plus facilement des nouveaux sites d'édition. En effet, ce n'est que récemment que l'analyse de l'ensemble du transcriptome et par conséquent, la découverte de multiples sites d'édition, a pu être réalisée à l'aide du séquençage haut débit de l'ARN (RNA-seq) (*Kiran, Baranov et al. 2010; Ramaswami, Li et al. 2014; Wulff, Sakurai et al. 2011*). L'ensemble des données issues de l'analyse bio-informatiques de RNA-seq ont permis la création de banque de données tel que DARNED (*Kiran, Baranov et al. 2010*)

ou RADAR (*Ramaswami, Li et al. 2014*) qui recensent l'ensemble des sites d'édités, soit 1.4 million chez l'humain, ainsi que leur localisation sur le génome avec le niveau d'édition correspondant.

IV.2.1 Stratégie d'analyse des données bioinformatiques : limiter les faux positifs

L'analyse des données de RNA-seq repose sur l'alignement de séquences reverse transcrites puis amplifiées, de longueur variable sur le génome de référence (hg 19). Bien qu'elle permette une large appréciation de l'éditome, elle est soumise à de nombreux paramètres source de faux positifs tels que : les erreurs induites par les enzymes au cours de la reverse transcription, de la PCR, ou du séquençage, mais également aux mutations somatiques et au polymorphisme nucléotidique entre individus d'une même espèce (*Lee, Ang. 2013*). Dans le but de réduire ces faux positifs il est donc souvent nécessaire d'inclure dans les analyses des critères d'éditabilité telle que la préférence nucléotidique. Dans notre étude, nous avons choisi d'analyser les résultats de RNA-seq après alignement sur le génome de référence conformément aux données de la littérature (*Lee, Ang. 2013; Peng, Cheng et al. 2012; Ramaswami, Zhang et al. 2013*) à l'aide du logiciel d'alignement rapide de petites et grandes séquences d'ARN : le logiciel STAR (*Dobin, Davis et al. 2013*). Le séquençage des « reads » orientées de 91 nucléotides produites par le séquenceur étant « paired end » c'est-à-dire séquencées dans les deux sens nous a permis de faciliter l'assemblage ainsi que l'alignement des séquences sur le génome de référence. Afin d'exclure de notre étude les potentiels faux positifs, nous avons éliminé les variations liées au polymorphisme nucléotidique entre individus d'une même espèce répertoriées dans la banque de données des SNP (dbSNP). Puis nous avons fixé une fréquence seuil de mutation afin de définir une variation récurrente. Ainsi, les variations présentes chez moins de 5 patients n'ont pas été étudiées car potentiellement secondaires à des erreurs de séquençage ou des mutations somatiques. Enfin, après avoir éliminé le risque de faux positifs, nous avons déterminé pour l'ensemble des variations observées leur localisation, le gène impliqué ainsi que la conséquence de la variation.

IV.2.2 Sites édités dans les LAM avec caryotype normal

Nos résultats nous ont permis d'identifier des variations A-en-G essentiellement localisées au niveau de séquences non codantes *Alu* (environ 90%), des 3'UTR, des sites d'épissage et des microARN. Ces observations sont en accord avec la littérature (*Bahn, Lee et al. 2012*), où la plus forte proportion de sites édités est localisée dans les régions non codantes dont 92% dans les séquences *Alu* (*Bazak, Haviv et al. 2014; Levanon, Eisenberg et al. 2004; Peng, Cheng et al. 2012; Ramaswami, Lin et al. 2012*). Seul 1% des sites édités sont localisés

sur des séquences codantes (*Kiran, Baranov et al. 2010*) et concernent essentiellement les neurotransmetteurs du SNC (*Ramaswami, Zhang et al. 2013*). Toutes les études, identifient les séquences *Alu* comme principale source d'activité des enzymes ADAR. Ceci s'explique d'une part du fait de leur forte proportion dans le génome humain (10%), d'autre part du fait de leur structure palindromique qui leur fait adopter une forme en hélice propice à l'édition et enfin parce qu'elles présentent une région central riche en adénosine (*Bahn, Lee et al. 2012; Grover, Mukerjii et al. 2004*). Ainsi, l'essentiel de l'activité des enzymes ADAR se situe au niveau des séquences *Alu* puisqu'elles éditent 78% d'entre elles et que la quasi-totalité de leur adénosines y sont éditées (*Bazak, Haviv et al. 2014; Bazak, Levanon et al. 2014*). Par ailleurs, ces séquences étant principalement localisées dans les introns et/ou les régions 3' et 5' UTR des gènes (*Kim, Kim et al. 2004*) permet d'expliquer pourquoi l'édition a lieu principalement dans les régions non codantes (*Ramaswami, Lin et al. 2012*). Les conséquences de l'édition des séquences *Alu* demeurent pourtant inconnues, elles pourraient être un mécanisme d'opposition d'intégration aléatoire de ces séquences dans le génome (*Kim, Kim et al. 2004*).

IV.2.3 Conséquences de l'édition dans les LAM avec caryotype normal

Parmi l'ensemble des sites édités de notre étude, aucun d'entre eux n'a induit de modifications susceptibles d'intervenir dans la leucémogénèse. En effet, les variations observées au niveau des séquences codantes et induisant une mutation faux-sens ont été éliminées en raison de la présence de ces mêmes mutations et dans le même ordre de grandeur chez les deux contrôles. Les substitutions même sens identifiées sur 13 gènes n'ont pas entraîné de modification protéique et nous n'avons pas observé de perte ou de gain de codon stop. Ces résultats s'expliquent en partie par le fait que l'édition touche peu les séquences codantes (1% des sites édités) (*Kiran, Baranov et al. 2010*) et concernent essentiellement les neurotransmetteurs du SNC (*Ramaswami, Zhang et al. 2013*). D'autre part, nous n'avons pas observé de conséquences de l'édition au niveau des sites de fixation de microARN ou des sites d'épissage, ni de modification de microARN matures. L'absence de conséquences biologiques observables dans notre étude relève en partie du fait que l'édition est un processus qui varie en fonction des tissus et reste difficile à mettre en évidence lorsqu'il est faible. En effet, les enzymes ADAR1 et ADAR2 bien que d'expression ubiquitaire, sont principalement actives dans le SNC, le thymus, le pancréas, la prostate, la rate (*Lee, Ang et al. 2013; Levanon, Eisenberg et al. 2004*), mais faiblement dans la moelle osseuse. Ainsi, il est d'autant plus difficile d'identifier des sites édités sur un tissu qui l'est faiblement. En effet, avant d'analyser les données de RNA-seq, nous avons essayé de mettre au point un test fonctionnel permettant

de mesurer l'activité des enzymes ADAR *in vitro* à partir d'un substrat connu pour être édité par les deux enzymes: le pré-ARN messager du récepteur à la sérotonine 5HT_{2C}R. Ce test consistait à incuber des extraits nucléaires purifiés de cellules HeLa dont l'activité d'édition des enzymes ADAR avait déjà été décrite avec le pré-ARN messager du récepteur à la sérotonine 5HT_{2C}R (Lehmann, Bass *et al.* 2000; Melcher, Maas *et al.* 1995; Melcher, Maas *et al.* 1996). L'activité des enzymes était détectée avec la méthode HRM (High-resolution melting analysis) avec une modification des courbes de fusion tandis que le séquençage direct du cDNA après PCR permettait d'identifier les sites édités. Pourtant, notre test n'a jamais permis de mesurer l'activité des enzymes à partir d'échantillon de patients, leur activité dans les lignées hématopoïétiques étant inférieure au seuil de détection de la méthode par HRM, il n'était par conséquent pas détecté par cette méthode. Des auteurs, Sakurai *et al* (Sakurai, Yano *et al.* 2010) se sont affranchis des faux positifs et du niveau d'édition par une nouvelle méthode appelée « inosine chemical erasing » (ICE) qui cyanoethyle les inosines présentes sur l'ARN. La cyanoéthylation bloque la reverse transcription et l'édition est mise en évidence par le séquençage qui objective l'absence de guanosine au niveau du site édité par rapport au brin d'ARN contrôle non soumis à cyanoéthylation. Par cette méthode, les auteurs ont identifié 5 000 nouveaux sites non détectés par les analyses bio-informatiques. Ces résultats mettent en évidence les limites de l'analyse des données de RNA-seq par les méthodes bio-informatiques. En effet, l'ensemble des résultats des études identifiant de nouveaux sites d'édités ne se superposent qu'en partie suggérant qu'ils ne reflètent pas l'ensemble du spectre édité.

IV.2.4 Potentiels faux négatifs

Enfin, parmi l'ensemble de nos résultats, il est probable que des variations aient été attribuées à tort au polymorphisme nucléotidique entre individus d'une même espèce à et donc automatiquement exclu de l'analyse. En effet, ces variations sont très fréquentes dans le génome humain et concernent aussi bien les séquences codantes que les non codantes. Elles ont été découvertes après alignement de courtes séquences d'ADN humain (EST= marqueur de séquence exprimée) avec l'ADN génomique, puis regroupées, classées et archivées dans une banque de données (dbSNP). Cependant, des auteurs, Eisenberg *et al*, (Eisenberg, Adamsky *et al.* 2005) ont identifiés plus de 100 variations A en G dans la banque de données des SNP dont 33% localisées dans des séquences *Alu*. D'après les auteurs, elles correspondraient en réalité à de l'édition et seraient donc classées dans la banque de données des dbSNP par erreur.

IV.2.5 Niveau d'expression des enzymes ADAR chez 40 patients atteints de LAM

Pour finir, nous avons dans un dernier temps comparé le niveau d'expression des enzymes ADAR entre les patients et les contrôles. Deux patients ont présenté une augmentation d'expression significative d'*ADAR1* corrélée à une plus forte expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Les leucémies aiguës étant des pathologies malignes associées à des processus inflammatoires majeurs, elles induisent une augmentation d'expression d'*ADAR1* dans les lymphocytes et les macrophages en raison de la présence d'éléments de réponse à l'interféron dans son promoteur (Der, Zhou et al. 1998; Patterson, Thomis et al. 1995; Yang, Luo et al. 2003). Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec ceux déjà décrits dans la littérature (Jiang, Crews, et al. 2013) où la comparaison du transcriptome entre des patients atteints de leucémie myéloïde en phase chronique (LMC) *versus* celui de patients en phase blastique montre une augmentation d'expression des gènes induit par l'interféron (γ), dont l'isoforme *ADAR1 p150*, pour les patients en phase blastique.

Au vue de l'ensemble de nos résultats, les patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique avec caryotype normal présentent des variations A en G qui résultent potentiellement de l'édition de leur ARN par les enzymes ADAR et qui doivent être validés sur ADN génomique. Ces sites, sont essentiellement situés aux niveaux des séquences non codantes pour lesquelles aucune conséquence n'a pu être mise en évidence. Ces résultats, en raison des limites de l'analyse bio-informatique, devront être ré-analysés à l'aide d'un nombre plus important de patients et d'une technique différente telle que la méthode ICE dans le but d'identifier davantage de sites.

CONCLUSIONS

En débutant ce travail, nous pensions que l'édition de l'ARN pouvait jouer un rôle dans les phénomènes d'oncogenèse des tumeurs hématopoïétiques. Deux types de résultats tendent à montrer que le phénomène d'édition est plutôt marginal dans les hémopathies malignes :

1) Le niveau d'expression des enzymes est le plus souvent identique entre tissus normaux et tissus tumoraux. Seules les lignées, qui sont des modèles biaisés des phénomènes d'oncogenèse, surexpriment les ADAR.

2) Les sites potentiels d'édition que nous avons observés par « RNA Sequencing » et qui doivent être formellement validés sur ADN génomique, siègent pour la plupart dans des régions non codantes pour lesquelles aucune conséquence n'a pu être mise en évidence.

Une piste intéressante pourrait être l'étude des variations d'expression de l'enzyme ADAR1 dans les cellules lymphoïdes activées. En effet, l'activation antigénique des lymphocytes B naïfs entraîne l'action d'une autre enzyme de l'édition, AID (Activation-induced cytidine deaminase), qui entraîne la commutation de classe et les hypermutations somatiques. Il pourrait y avoir un effet combiné de ces deux enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bahn JH, Lee JH, Li G, Greer C, Peng G, Xiao X. Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing. *Genome Res.* 2012 Jan;22(1):142-50.
2. Barraud P, Allain FH. ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;353:35-60.
3. Basilio C, Wahba AJ, Lengyel P, Speyer JF, Ochoa S. Synthetic polynucleotides and the amino acid code V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Apr 15;48:613-6
4. Bass BL. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:817-46.
5. Bazak L, Haviv A, Barak M, Jacob-Hirsch J, Deng P, Zhang R, Isaacs FJ, Rechavi G, Li JB, Eisenberg E, Levanon EY. A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. *Genome Res.* 2014 Mar;24(3):365-76.
6. Bazak L, Levanon EY, Eisenberg E. Genome-wide analysis of Alu editability. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):6876-84.
7. Beghini A, Ripamonti CB, Peterlongo P, Roversi G, Cairoli R, Morra E, Larizza L. RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia. *Hum Mol Genet.* 2000 Sep 22;9(15):2297-304.
8. Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* 1986 Sep 12;46(6):819-26.
9. Blow MJ, Grocock RJ, van Dongen S, Enright AJ, Dicks E, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR. RNA editing of human microRNAs. *Genome Biol.* 2006;7(4):R27.
10. Bousquet M, Quelen C, Rosati R, Mansat-De Mas V, La Starza R, Bastard C, Lippert E, Talmant P, Lafage-Pochitaloff M, Leroux D, Gervais C, Viguié F, Lai JL, Terre C, Beverlo B, Sambani C, Hagemeijer A, Marynen P, Delsol G, Dastugue N, Mecucci C, Brousset P. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med.* 2008 Oct 27;205(11):2499-506.
11. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):857-66.
12. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, Degos L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia I Clinical results. *Blood.* 1990 Nov 1;76(9):1704-9.
13. Cenci C, Barzotti R, Galeano F, Corbelli S, Rota R, Massimi L, Di Rocco C, O'Connell MA, Gallo A. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation. *J Biol Chem.* 2008 Mar 14;283(11):7251-60.

14. Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K. A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA*. 2000 May;6(5):755-67.
15. Chen L, Li Y, Lin CH, Chan TH, Chow RK, Song Y, Liu M, Yuan YF, Fu L, Kong KL, Qi L, Li Y, Zhang N, Tong AH, Kwong DL, Man K, Lo CM, Lok S, Tenen DG, Guan XY. Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):209-16.
16. Cheng K, Sportoletti P, Ito K, Clohessy JG, Teruya-Feldstein J, Kutok JL, Pandolfi PP. The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. *Blood*. 2010 Apr 22;115(16):3341-5.
17. Cho DS, Yang W, Lee JT, Shiekhhattar R, Murray JM, Nishikura K. Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):17093-102.
18. Choudhury Y, Tay FC, Lam DH, Sandanaraj E, Tang C, Ang BT, Wang S. Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells. *J Clin Invest*. 2012 Nov 1;122(11):4059-76.
19. De Weer A, Speleman F, Cauwelier B, Van Roy N, Yigit N, Verhasselt B, De Moerloose B, Benoit Y, Noens L, Selleslag D, Lippert E, Struski S, Bastard C, De Paepe A, Vandenberghe P, Hagemeijer A, Dastugue N, Poppe B, Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). EVI1 overexpression in t(3;17) positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EVI1 to the MSI2 locus at 17q22. *Haematologica*. 2008 Dec;93(12):1903-7.
20. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2640-53.
21. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15623-8.
22. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2099-107.
23. Desterro JM, Keegan LP, Lafarga M, Berciano MT, O'Connell M, Carmo-Fonseca M. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1805-18.
24. Desterro JM, Keegan LP, Jaffray E, Hay RT, O'Connell MA, Carmo-Fonseca M. SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity. *Mol Biol Cell*. 2005 Nov;16(11):5115-26.
25. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1079-82.
26. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15-21.

27. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD, European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453-74.
28. Doria M, Neri F, Gallo A, Farace MG, Michienzi A. Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res*. 2009 Sep;37(17):5848-58.
29. Eggington JM, Greene T, Bass BL. Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nat Commun*. 2011;2:319.
30. Eisenberg E, Adamsky K, Cohen L, Amariglio N, Hirshberg A, Rechavi G, Levanon EY. Identification of RNA editing sites in the SNP database. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):4612-7.
31. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*. 2013 May;22(5):545-56.
32. Feng Y, Sansam CL, Singh M, Emeson RB. Altered RNA editing in mice lacking ADAR2 autoregulation. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(2):480-8
33. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Grealley JM, Valk PJ, Löwenberg B, Delwel R, Melnick A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):13-27.
34. Fritz J, Strehblow A, Taschner A, Schopoff S, Pasierbek P, Jantsch MF. RNA-regulated interaction of transportin-1 and exportin-5 with the double-stranded RNA-binding domain regulates nucleocytoplasmic shuttling of ADAR1. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar;29(6):1487-97.
35. Galeano F, Rossetti C, Tomaselli S, Cifaldi L, Lezzerini M, Pezzullo M, Boldrini R, Massimi L, Di Rocco CM, Locatelli F, Gallo A. ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis. *Oncogene*. 2013 Feb 21;32(8):998-1009.
36. Gallo A, Galardi S. A-to-I RNA editing and cancer: from pathology to basic science. *RNA Biol*. 2008 Jul-Sep;5(3):135-9.
37. Gandy SZ, Linnstaedt SD, Muralidhar S, Cashman KA, Rosenthal LJ, Casey JL. RNA editing of the human herpesvirus 8 kaposin transcript eliminates its transforming activity and is induced during lytic replication. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13544-51.
38. George CX, Samuel CE. Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4621-6.
39. George CX, Wagner MV, Samuel CE. Expression of interferon-inducible RNA adenosine deaminase ADAR1 during pathogen infection and mouse embryo development involves

- tissue-selective promoter utilization and alternative splicing. *J Biol Chem*. 2005 Apr 15;280(15):15020-8.
40. Gerber A, O'Connell MA, Keller W. Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. *RNA*. 1997 May;3(5):453-63.
 41. Gerber AP, Keller W. RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2001 Jun;26(6):376-84.
 42. Grisendi S, Pandolfi PP. NPM mutations in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):291-2.
 43. Grover D, Mukerji M, Bhatnagar P, Kannan K, Brahmachari SK. Alu repeat analysis in the complete human genome: trends and variations with respect to genomic composition. *Bioinformatics*. 2004 Apr 12;20(6):813-7.
 44. Gu T, Buaas FW, Simons AK, Ackert-Bicknell CL, Braun RE, Hibbs MA. Canonical A-to-I and C-to-U RNA editing is enriched at 3'UTRs and microRNA target sites in multiple mouse tissues. *PLoS One*. 2012;7(3):e33720.
 45. Hartner JC, Schmittwolf C, Kispert A, Müller AM, Higuchi M, Seeburg PH. Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4894-902.
 46. Hartner JC, Walkley CR, Lu J, Orkin SH. ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):109-15.
 47. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000 Feb 3;19(5):624-31.
 48. Herbert A, Schade M, Lowenhaupt K, Alfken J, Schwartz T, Shlyakhtenko LS, Lyubchenko YL, Rich A. The Zalpha domain from human ADAR1 binds to the Z-DNA conformer of many different sequences. *Nucleic Acids Res*. 1998 Aug 1;26(15):3486-93.
 49. Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1361-70.
 50. Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*. 2000 Jul 6;406(6791):78-81.
 51. Hochberg M, Gilead L, Markel G, Nemlich Y, Feiler Y, Enk CD, Denichenko P, Karni R, Ingber A. Insulin-like growth factor-binding protein-7 (IGFBP7) transcript: A-to-I editing events in normal and cancerous human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 2013 Aug;305(6):519-28.
 52. Hough RF, Bass BL. Purification of the *Xenopus laevis* double-stranded RNA adenosine deaminase. *J Biol Chem*. 1994 Apr 1;269(13):9933-9.

53. Iizasa H, Wulff BE, Alla NR, Maragkakis M, Megraw M, Hatzigeorgiou A, Iwakiri D, Takada K, Wiedmer A, Showe L, Lieberman P, Nishikura K. Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *J Biol Chem*. 2010 Oct 22;285(43):33358-70.
54. Iizasa H, Nishikura K. A new function for the RNA-editing enzyme ADAR1. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):16-8.
55. Ishiuchi S, Yoshida Y, Sugawara K, Aihara M, Ohtani T, Watanabe T, Saito N, Tsuzuki K, Okado H, Miwa A, Nakazato Y, Ozawa S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *J Neurosci*. 2007 Jul 25;27(30):7987-8001.
56. Jacobs MM, Fogg RL, Emeson RB, Stanwood GD. ADAR1 and ADAR2 expression and editing activity during forebrain development. *Dev Neurosci*. 2009;31(3):223-37.
57. Jiang Q, Crews LA, Barrett CL, Chun HJ, Court AC, Isquith JM, Zipeto MA, Goff DJ, Minden M, Sadarangani A, Rusert JM, Dao KH, Morris SR, Goldstein LS, Marra MA, Frazer KA, Jamieson CH. ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 15;110(3):1041-6.
58. Jin Y, Zhang W, Li Q. Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB Life*. 2009 Jun;61(6):572-8.
59. Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S. Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene*. 2005 Dec 19;363:193-201.
60. Kawahara Y, Megraw M, Kreider E, Iizasa H, Valente L, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(16):5270-80.
61. Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhata R, Nishikura K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep*. 2007 Aug;8(8):763-9.
62. Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*. 2007 Feb 23;315(5815):1137-40.
63. Keegan LP, Leroy A, Sproul D, O'Connell MA. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biol*. 2004;5(2):209.
64. Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matise TC, Buyske S, Gabriel A. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome Res*. 2004 Sep;14(9):1719-25.
65. Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K. Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11457-61.
66. Kiran A, Baranov PV. DARNED: a DAtabase of RNa EDiting in humans. *Bioinformatics*. 2010 Jul 15;26(14):1772-6.

67. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2393-8.
68. Kuttan A, Bass BL. Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 27;109(48):E3295-304.
69. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Le monde complexe et mouvant des ARN. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 2010. 25, 4-25
70. Lanfranco MF, Seitz PK, Morabito MV, Emeson RB, Sanders-Bush E, Cunningham KA. An innovative real-time PCR method to measure changes in RNA editing of the serotonin 2C receptor (5-HT(2C)R) in brain. *J Neurosci Methods*. 2009 May 15;179(2):247-57.
71. Laxminarayana D, Khan IU, O'Rourke KS, Giri B. Induction of 150-kDa adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR)-1 gene expression in normal T lymphocytes by anti-CD3-epsilon and anti-CD28. *Immunology*. 2007 Dec;122(4):623-33.
72. Lee JH, Ang JK, Xiao X. Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying RNA editing and other single-nucleotide variants. *RNA*. 2013 Jun;19(6):725-32.
73. Lehmann KA, Bass BL. The importance of internal loops within RNA substrates of ADAR1. *J Mol Biol*. 1999 Aug 6;291(1):1-13.
74. Lehmann KA, Bass BL. Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry*. 2000 Oct 24;39(42):12875-84.
75. Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, Fligelman ZY, Shoshan A, Pollock SR, Sztybel D, Olshansky M, Rechavi G, Jantsch MF. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol*. 2004 Aug;22(8):1001-5.
76. Liang H, Landweber LF. Hypothesis: RNA editing of microRNA target sites in humans?. *RNA*. 2007 Apr;13(4):463-7. PubMed PMID: 17255198; PubMed Central PMCID: PMC1831856.
77. Liu Y, George CX, Patterson JB, Samuel CE. Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4419-28.
78. Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Höger T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science*. 1994 Dec 9;266(5191):1709-13.
79. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997 Nov 7;278(5340):1059-64.
80. Ma CH, Chong JH, Guo Y, Zeng HM, Liu SY, Xu LL, Wei J, Lin YM, Zhu XF, Zheng GG. Abnormal expression of ADAR1 isoforms in Chinese pediatric acute leukemias. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 11;406(2):245-51.

81. Maas S, Gerber AP, Rich A. Identification and characterization of a human tRNA-specific adenosine deaminase related to the ADAR family of pre-mRNA editing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):8895-900.
82. Maas S, Gommans WM. Novel exon of mammalian ADAR2 extends open reading frame. *PLoS One*. 2009;4(1):e4225.
83. Maas S, Gommans WM. Identification of a selective nuclear import signal in adenosine deaminases acting on RNA. *Nucleic Acids Res*. 2009 Sep;37(17):5822-9.
84. Maas S, Kawahara Y, Tamburro KM, Nishikura K. A-to-I RNA editing and human disease. *RNA Biol*. 2006 Jan-Mar;3(1):1-9.
85. Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14687-92.
86. Macbeth MR, Schubert HL, Vandemark AP, Lingam AT, Hill CP, Bass BL. Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1534-9.
87. Marcucci R, Brindle J, Paro S, Casadio A, Hempel S, Morrice N, Bisso A, Keegan LP, Del Sal G, O'Connell MA. Pin1 and WWP2 regulate GluR2 Q/R site RNA editing by ADAR2 with opposing effects. *EMBO J*. 2011 Aug 16;30(20):4211-22.
88. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipok C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058-66.
89. Melcher T, Maas S, Higuchi M, Keller W, Seeburg PH. Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. *J Biol Chem*. 1995 Apr 14;270(15):8566-70.
90. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M. A mammalian RNA editing enzyme. *Nature*. 1996 Feb 1;379(6564):460-4.
91. Mittaz L, Scott HS, Rossier C, Seeburg PH, Higuchi M, Antonarakis SE. Cloning of a human RNA editing deaminase (ADARB1) of glutamate receptors that maps to chromosome 21q223. *Genomics*. 1997 Apr 15;41(2):210-7.
92. Nachmani D, Zimmermann A, Oiknine Djian E, Weisblum Y, Livneh Y, Khanh Le VT, Galun E, Horejsi V, Isakov O, Shomron N, Wolf DG, Hengel H, Mandelboim O. MicroRNA editing facilitates immune elimination of HCMV infected cells. *PLoS Pathog*. 2014 Feb;10(2):e1003963.
93. Nemlich Y, Greenberg E, Ortenberg R, Besser MJ, Barshack I, Jacob-Hirsch J, Jacoby E, Eyal E, Rivkin L, Prieto VG, Chakravarti N, Duncan LM, Kallenberg DM, Galun E, Bennett DC, Amariglio N, Bar-Eli M, Schachter J, Rechavi G, Markel G. MicroRNA-

- mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth. *J Clin Invest*. 2013 Jun 3;123(6):2703-18.
94. Nie Y, Hammond GL, Yang JH. Double-stranded RNA deaminase ADAR1 increases host susceptibility to virus infection. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):917-23.
 95. Nie Y, Ding L, Kao PN, Braun R, Yang JH. ADAR1 interacts with NF90 through double-stranded RNA and regulates NF90-mediated gene expression independently of RNA editing. *Mol Cell Biol*. 2005 Aug;25(16):6956-63.
 96. Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:321-49.
 97. Oh DB, Kim YG, Rich A. Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16666-71.
 98. Osenberg S, Paz Yaacov N, Safran M, Moshkovitz S, Shtrichman R, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Keshet G, Amariglio N, Itskovitz-Eldor J, Rechavi G. Alu sequences in undifferentiated human embryonic stem cells display high levels of A-to-I RNA editing. *PLoS One*. 2010 Jun 21;5(6):e11173.
 99. Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5303-7.
 100. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):263-70.
 101. Park SR. Activation-induced Cytidine Deaminase in B Cell Immunity and Cancers. *Immune Netw*. 2012 Dec;12(6):230-9.
 102. Patterson JB, Thomis DC, Hans SL, Samuel CE. Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology*. 1995 Jul 10;210(2):508-11.
 103. Paz N, Levanon EY, Amariglio N, Heimberger AB, Ram Z, Constantini S, Barbash ZS, Adamsky K, Safran M, Hirschberg A, Krupsky M, Ben-Dov I, Cazacu S, Mikkelsen T, Brodie C, Eisenberg E, Rechavi G. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*. 2007 Nov;17(11):1586-95.
 104. Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. 2006 Mar 2;49(5):719-33.
 105. Peng Z, Cheng Y, Tan BC, Kang L, Tian Z, Zhu Y, Zhang W, Liang Y, Hu X, Tan X, Guo J, Dong Z, Liang Y, Bao L, Wang J. Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat Biotechnol*. 2012 Feb 12;30(3):253-60.
 106. Polson AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):454-6.
 107. Polson AG, Bass BL. Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase. *EMBO J*. 1994 Dec 1;13(23):5701-11.

108. Poulsen H, Nilsson J, Damgaard CK, Egebjerg J, Kjems J. CRM1 mediates the export of ADAR1 through a nuclear export signal within the Z-DNA binding domain. *Mol Cell Biol*. 2001 Nov;21(22):7862-71.
109. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*. 1987 Sep 11;50(6):831-40.
110. Qiu W, Wang X, Buchanan M, He K, Sharma R, Zhang L, Wang Q, Yu J. ADAR1 is essential for intestinal homeostasis and stem cell maintenance. *Cell Death Dis*. 2013 Apr 18;4:e599.
111. Quelen C. La translocation chromosomique t(X;6)(p11;q23) dans la leucémie aiguë à basophiles. Doctorat de l'université de Toulouse. 2011
112. Ramaswami G, Li JB. RADAR: a rigorously annotated database of A-to-I RNA editing. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D109-13.
113. Ramaswami G, Zhang R, Piskol R, Keegan LP, Deng P, O'Connell MA, Li JB. Identifying RNA editing sites using RNA sequencing data alone. *Nat Methods*. 2013 Feb;10(2):128-32.
114. Ramaswami G, Lin W, Piskol R, Tan MH, Davis C, Li JB. Accurate identification of human Alu and non-Alu RNA editing sites. *Nat Methods*. 2012 Jun;9(6):579-81.
115. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar 16;12(4):282-94.
116. Rieder LE, Staber CJ, Hoopengardner B, Reenan RA. Tertiary structural elements determine the extent and specificity of messenger RNA editing. *Nat Commun*. 2013;4:2232.
117. Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*. 1999 May 6;399(6731):75-80.
118. Rueter SM, Burns CM, Coode SA, Mookherjee P, Emeson RB. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1491-4.
119. Sakurai M, Yano T, Kawabata H, Ueda H, Suzuki T. Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome. *Nat Chem Biol*. 2010 Oct;6(10):733-40.
120. Sansam CL, Wells KS, Emeson RB. Modulation of RNA editing by functional nucleolar sequestration of ADAR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14018-23.
121. Saunders LR, Barber GN. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):961-83.
122. Savva YA, Rieder LE, Reenan RA. The ADAR protein family. *Genome Biol*. 2012 Dec 28;13(12):252.
123. Scadden AD. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(6):489-96.

- 124.Scadden AD, Smith CW. RNAi is antagonized by A-to-I hyper-editing. *EMBO Rep.* 2001 Dec;2(12):1107-11.
- 125.Schoft VK, Schopoff S, Jantsch MF. Regulation of glutamate receptor B pre-mRNA splicing by RNA editing. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3723-32.
- 126.Seeburg PH, Higuchi M, Sprengel R. RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 May;26(2-3):217-29.
- 127.Sharma R, Wang Y, Zhou P, Steinman RA, Wang Q. An essential role of RNA editing enzyme ADAR1 in mouse skin. *J Dermatol Sci.* 2011 Oct;64(1):70-2.
- 128.Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985 Jun 13-19;315(6020):550-4.
- 129.Shtrichman R, Germanguz I, Mandel R, Ziskind A, Nahor I, Safran M, Osenberg S, Sherf O, Rechavi G, Itskovitz-Eldor J. Altered A-to-I RNA editing in human embryogenesis. *PLoS One.* 2012;7(7):e41576.
- 130.Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell.* 1991 Oct 4;67(1):11-9.
- 131.Steinman RA, Yang Q, Gasparetto M, Robinson LJ, Liu X, Lenzner DE, Hou J, Smith C, Wang Q. Deletion of the RNA-editing enzyme ADAR1 causes regression of established chronic myelogenous leukemia in mice. *Int J Cancer.* 2013 Apr 15;132(8):1741-50.
- 132.Stephens OM, Haudenschild BL, Beal PA. The binding selectivity of ADAR2's dsRBMs contributes to RNA-editing selectivity. *Chem Biol.* 2004 Sep;11(9):1239-50.
- 133.Strehblow A, Hallegger M, Jantsch MF. Nucleocytoplasmic distribution of human RNA-editing enzyme ADAR1 is modulated by double-stranded RNA-binding domains, a leucine-rich export signal, and a putative dimerization domain. *Mol Biol Cell.* 2002 Nov;13(11):3822-35.
- 134.Taylor DR, Puig M, Darnell ME, Mihalik K, Feinstone SM. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol.* 2005 May;79(10):6291-8.
- 135.Thomas EK, Cancelas JA, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia.* 2008 May;22(5):898-904.
- 136.Tomaselli S, Bonamassa B, Alisi A, Nobili V, Locatelli F, Gallo A. ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference. *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 19;14(11):22796-816.
- 137.Toth AM, Li Z, Cattaneo R, Samuel CE. RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 suppresses measles virus-induced apoptosis and activation of protein kinase PKR. *J Biol Chem.* 2009 Oct 23;284(43):29350-6.
- 138.Uribealago I, Di Croce L. Dynamics of epigenetic modifications in leukemia. *Brief Funct Genomics.* 2011 Jan;10(1):18-29.
- 139.Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the

- World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
140. Wahlstedt H, Daniel C, Ensterö M, Ohman M. Large-scale mRNA sequencing determines global regulation of RNA editing during brain development. *Genome Res*. 2009 Jun;19(6):978-86.
 141. Wang IX, So E, Devlin JL, Zhao Y, Wu M, Cheung VG. ADAR regulates RNA editing, transcript stability, and gene expression. *Cell Rep*. 2013 Nov 14;5(3):849-60.
 142. Wang Q. RNA editing catalyzed by ADAR1 and its function in mammalian cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2011 Aug;76(8):900-11.
 143. Wang Q, O'Brien PJ, Chen CX, Cho DS, Murray JM, Nishikura K. Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin_{2C} receptors. *J Neurochem*. 2000 Mar;74(3):1290-300.
 144. Wang Q, Khillan J, Gadue P, Nishikura K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science*. 2000 Dec 1;290(5497):1765-8.
 145. Wang Q, Miyakoda M, Yang W, Khillan J, Stachura DL, Weiss MJ, Nishikura K. Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4952-61.
 146. Wang Y, Samuel CE. Adenosine deaminase ADAR1 increases gene expression at the translational level by decreasing protein kinase PKR-dependent eIF-2 α phosphorylation. *J Mol Biol*. 2009 Nov 6;393(4):777-87.
 147. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 8;105(14):5477-82.
 148. Weier HU, George CX, Greulich KM, Samuel CE. The interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) maps to human chromosome 1q211-212. *Genomics*. 1995 Nov 20;30(2):372-5.
 149. Wulff BE, Nishikura K. Substitutional A-to-I RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010 Jul-Aug;1(1):90-101.
 150. Wulff BE, Sakurai M, Nishikura K. Elucidating the inosinome: global approaches to adenosine-to-inosine RNA editing. *Nat Rev Genet*. 2011 Feb;12(2):81-5.
 151. XuFeng R, Boyer MJ, Shen H, Li Y, Yu H, Gao Y, Yang Q, Wang Q, Cheng T. ADAR1 is required for hematopoietic progenitor cell survival via RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17763-8.
 152. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2434-9.
 153. Yang JH, Luo X, Nie Y, Su Y, Zhao Q, Kabir K, Zhang D, Rabinovici R. Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology*. 2003 May;109(1):15-23.

154. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, Nishikura K. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Jan;13(1):13-21.
155. Yi-Brunozzi HY, Stephens OM, Beal PA. Conformational changes that occur during an RNA-editing adenosine deamination reaction. *J Biol Chem.* 2001 Oct 12;276(41):37827-33.
156. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, Ohno R, Naoe T. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):2945-8.
157. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 13;103(24):9136-41.

RÉSUMÉ

L'édition de l'ARN consiste en une modification post-transcriptionnelle qui génère une séquence différente de celle de l'ADN génomique et contribue à la diversité du transcriptome et des protéines. La réaction d'édition la plus fréquente résulte de la conversion d'une adénosine en inosine, mécanisme catalysé par les enzymes ADAR1 et ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA). La dérégulation de ce processus est impliquée dans le développement et la progression tumorale de nombreux cancers tels que les glioblastomes ou les leucémies aiguës.

Les objectifs de notre travail étaient de déterminer le rôle des enzymes ADAR dans l'établissement du phénotype tumoral à partir de l'analyse du transcriptome de 40 patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique avec caryotype normal. Nous souhaitons également déterminer le niveau d'expression des enzymes ADAR à partir de plusieurs types de tumeurs hématopoïétiques issues de lignées cellulaires humaines.

Nous avons mis en évidence une surexpression des isoformes d'ADAR1 et plus particulièrement d'*ADAR1 p110* dans les lymphomes B et les LAL-B ainsi qu'une surexpression d'*ADAR1 p110*, *ADAR1 p150* et *ADAR2* dans les lymphomes T et les LAL-T. Nous avons également montré que les patients atteints de LAM avec un caryotype normal présentent des sites édités par les enzymes ADAR, essentiellement localisés au niveau des séquences non codantes, pour lesquelles aucune conséquence n'a pu être mise en évidence. Ainsi, l'analyse du transcriptome d'un nombre plus important de patients sera nécessaire pour identifier davantage de sites édités et améliorer la compréhension du rôle de ces protéines dans la leucémogénèse.

Mots-clefs : édition ; ARN ; protéines ADAR ; leucémie aiguë myéloblastique

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.